

Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie
der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid

1982

Jürgen Schmidt

J Ü R G E N S C H M I D T

Wilhelm Leuschner-Straße 55

5106 Erzhausen/Darmstadt

Tel. 06150 / 8 12 19

Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie
der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen zur Gewinnung
von Antikörpern gegen
humanes C-Peptid

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von J ü r g e n S c h m i d t
aus Erzhausen/Darmstadt

M a i n z 1 9 8 2

Dekan: Prof.Dr.med. K.H.Bäßler

1. Gutachter: Prof.Dr.med. J.Beyer

2. Gutachter: Prof.Dr.rer.nat. B. Morsches

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1982



Meiner Mutter

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A. Einführung

I.	Allgemeine Problematik	1 - 2
II.	Bisherige Erkenntnisse und Nachweisverfahren des C-Peptids	2 - 8

B. Eigene Untersuchungen

I.	Einleitung und Überblick	9 - 10
II.	Versuch der laborchemischen Synthese von 1-Insuliny1-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzol nach der Methode von H.S.Tager unter Verwendung von Schweineinsulin als antigene Substanz (Lit.39)	10 - 25
III.	Physikalisch-chemische Untersuchung des 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols	26 - 58
IV.	Immunisierung von Meerschweinchen mit Insulinderivat vom Schwein	59 - 62
V.	Bestimmung des Titers an Insulinantikörpern im Radioimmunoassay	63 - 66
VI.	Laborchemische Synthese von 1-C-Peptidyl-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzol unter Verwendung von porcinem C-Peptid	67 - 71
VII.	Physikalisch-chemische Analyse des synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzols	72 - 86
VIII.	Laborchemische Synthese von 1-C-Peptidyl-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzol unter Verwendung von humanem C-Peptid	86 - 92
IX.	Immunisierung von Kaninchen mit 1-C-Peptidyl-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzol	92 - 95
X.	Bestimmung des Titers an C-Peptidantikörpern im Kaninchenserum mittels Radioimmunoassay	95 - 98
XI.	Zusammenfassung	98 - 102

XII. Diskussion	102 - 104
XIII. Tabellarischer Anhang	105 - 130
XIV. Literaturregister(Lit.)	131 - 135
C. <u>Danksagung</u>	136
D. <u>Curriculum vitae</u>	137 - 138

A. Einführung

A. I. Allgemeine Problematik

"humanes C-Peptid ist ein sehr schwaches Antigen, da ihm aufgrund seiner zufällig aufgewinkelten und in sich gestreckten Konformation eine charakteristische antigene Bindungsstelle fehlt; dabei ist das C-Peptid vieler verschiedenen Zufallszuständen unterworfen, von denen keiner in ausreichend hoher Konzentration auftritt." (Lit.1)

Darüber hinaus steht humanes C-Peptid zur Zeit nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung. Bei der Gewinnung von Antikörpern gegen dieses Peptid ist es daher notwendig, mit möglichst geringen Antigenmengen einen hohen Titer an C-Peptidantikörpern zu erzielen. Es wurde daher versucht, die von Tager (Lit.2) am Beispiel des Glucagons beschriebene Methode zur Gewinnung von Antikörpern beim humanen C-Peptid nachzuvollziehen. Mit dieser Methode hatte man zuvor den bis dahin höchsten Titer an Glucagonantikörpern erzeugen können.

Da für die nachfolgenden Untersuchungen nur insgesamt 4mg humanes C-Peptid (Synthese: Prof.Dr.Seliger, Farbwerke Hoechst, Frankfurt/Main) zur Verfügung standen, wurden die Koppelungsbedingungen zunächst am porcinen Insulin und anschließend am porcinen C-Peptid modellweise durchgeführt. Daraufhin wurde in dem Hauptversuch das wirksame vollendige 1-C-Peptidyl-5-Amino-2,4-Dinitrobenzol zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid synthetisiert. Dieses Syntheseprodukt wurde zu gleichen Teilen mit Freundschem Adjuvant emulgiert und insgesamt viermal im vierzehntägigen Abstand sechs Kanarienvögel injiziert. Die dabei erzielten Antikörper wurden mit Hilfe eines Radioimmunoassay erfaßt.

Der Bindungsanteil des C-Peptids an das Hinderalbumin wurde sowohl gelelektrophoretisch als auch radiochemisch bestimmt. Da

jedoch für diese Untersuchung kein weiteres humanes C-Peptid zur Verfügung stand, wurde hierfür ersatzweise porcines C-Peptid verwendet.

A. II. Bisherige Erkenntnisse und Nachweisverfahren des C-Peptids

A. II.1. Biosynthese, Struktur und Sekretion des C-Peptids

An den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums der β -Zelle des endokrinen Pankreas synthetisiertes Proinsulin wird im Golgi-Apparat sowie in dessen freien Diktyosomen unter gemeinsamer Einwirkung von Trypsin und Carboxypeptidase B im äquimolaren Verhältnis in Insulin und C-Peptid gespalten. Dabei werden je Mol Proinsulin 3 Mol Arginin und 1 Mol Lysin abgespalten. Es entsteht das Dipeptid Arg-Arg aus den Positionen 31 und 32 sowie das Dipeptid Lys-Arg aus den Positionen 64 und 65 des Proinsulins(Lit.3). Die Aminosäuresequenzen des humanen und des porcinen C-Peptids sind aus Abb. B.VI.1. ersichtlich. Der mittels Colchizin verzögerbare intrazelluläre Transport des (Pro)insulins erfolgt über die Mikrotubuli(Lit.4).

Obwohl C-Peptid und Insulin (sowie ein geringer Anteil an Proinsulin) im stöchiometrischen Verhältnis über Emiocytose aus der β -Zellgranula in die Blutbahn sezerniert werden, ergibt sich nach fünfminütiger Glucosebelastung im Pfortaderblut ein C-Peptid/Insulin Quotient von über 1.6(Lit.5). Faber et al. fand dabei, daß der C-Peptid/Insulin Quotient im Nüchternzustand sogar zwischen 5:1 und 7:1 liegt, hingegen nach Glucosebelastung auf ein Verhältnis von 2:1 oder 3:1 abfällt. Er führte dies auf geringere Basisspiegel des Insulins zurück, die diesen relativ größeren Anstieg des Insulins ermöglichten (Lit.6).

Die insgesamt relativ höheren C-Peptidwerte begründen sich in dem unterschiedlichen extrapankreatischen Metabolismus beider

Peptide, wobei das C-Peptid nur zu einem geringen Prozentsatz in der Leber abgebaut, hauptsächlich aber über die Niere ausgeschieden wird. Insulin hingegen wird zu etwa 50% direkt bei seiner ersten Leberpassage dort inaktiviert.

Die beim Insulin gefundene Halbwertszeit belief sich auf 7,5 Minuten, wohingegen die Halbwertszeit des C-Peptids mit 26,5 Minuten bestimmt wurde (Lit.47). Der sich daraus ergebende höhere Absolutwert des C-Peptids macht es zu einem noch empfindlicheren Indikator der residualen B-Zellfunktion.

A. II.2. Isolierung und Synthese des C-Peptids

Im Jahre 1969 gelang Clark und Mitarbeitern (Lit.7) die Isolierung eines C-Peptidfragmentes aus Rinder- und Menschenpankreas. Gefrorenes Rinderpankreas sowie Menschenpankreas von verstorbenen nicht-Diabetikern wurde physikalisch aufbereitet und nach Extraktion über Sephadex G-50 mit 1 M Essigsäure chromatographisch gereinigt. Die insulinhaltigen Fraktionen wurden radiochemisch mittels 125-Jod-Insulin im Radioimmunoassay bestimmt. Die endgültige Isolierung erfolgte papierelektrophoretisch. Im gleichen Jahre gelang auch Sundby und Markussen die Isolierung von C-Peptid aus Rinder- und Schweinepankreas (Lit.48).

Die Vollsynthese des C-Peptids erfolgte erstmals in den Jahren 1973/74 durch Geiger (Lit.8,9), König (Lit.10), Jäger (Lit.11), Naithani (Lit.12) und Yanaihara (Lit.13).

A. II.3. Klinische Relevanz der C-Peptidbestimmung

Der Serum-C-Peptidspiegel stellt den zur Zeit spezifischsten und empfindlichsten Parameter zur Erfassung der Restsekretionskapazität der insulinproduzierenden B-Zelle dar, insbesondere auch bei insulinpflichtigen Diabetikern mit zirkulierenden In-

sulinantikörpern(Lit.14). Auch die Wiederherstellung der B-Zellfunktion nach einer Mumpspankreatitis läßt sich mit dieser Methode erfassen. Weiterhin finden sich bei dem überwiegenden Anteil der Patienten mit einem Insulinom signifikant erhöhte Proinsulinwerte, die bei der C-Peptidbestimmung entsprechend der übereinstimmenden Aminosäuresequenzen miterfaßt werden; der C-Peptidspiegel ist in diesen Fällen meist normal oder auch erniedrigt(Lit.15,16). Die differentialdiagnostisch davon abzugrenzende Hypoglycaemia facititia läßt sich an einem normalen bis erniedrigten Serum-C-Peptidspiegel bei jedoch parallelem Verhalten des Proinsulins erkennen(Lit.17). Darüber hinaus wurde die Bestimmung des Serum-C-Peptidspiegels beim Glibenclamid-Glucose-Test für eine Vorhersage hinsichtlich der Wirksamkeit einer Therapie mit oralen Antidiabetika empfohlen(Lit.18).

Ein erneuter Anstieg des Serum-C-Peptidspiegels nach einer totalen Duodenopankreatektomie aufgrund eines Pankreastumors weist auf ein Rezidiv oder auch auf eine Filialisierung des Primärtumors hin(Lit.19).

Die zyklischen Veränderungen der B-Zellfunktion lassen sich auch für wissenschaftliche und weitere sich daraus ergebende diagnostisch-therapeutische Zwecke sehr gut mittels einer C-Peptidbestimmung erfassen. Erhöhte Serum-C-Peptidspiegel finden sich aber auch bei Patienten mit ausgeprägter Adipositas sowie bei Patienten mit einer Akromegalie, dort jedoch nur in der frühen Phase des Glucosetoleranztestes. Patienten mit einer Dystrophia myotonica oder mit einem Cushing-Syndrom(Lit.20) zeigen normale Serum-C-Peptidspiegel [1,1ng-3,6ng C-Peptid/ml Serum, abhängig vom Körpergewicht nach Broca sowie von der jeweiligen Bestimmungsmethode(Lit.47)], urämische Patienten sowie Patienten mit einem Myxödem oder einer Hypertriglyceridämie zeigen ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich ihres Serum-C-Peptidspiegels(Lit.20). Das Proinsulin/Insulin Verhältnis steigt mit dem Alter(Lit.21), bei schwerer Hypokaliämie(Lit.22), beim Phäochromozytom(Lit.23), bei chronischen Nierenerkrankungen(Lit.24)

sowie infolge der Bindung an Antikörper beim insulinpflichtigen Diabetiker an (Lit.25,26).

A. II.4. Antigenität und Antigenloci des humanen C-Peptids

Mit bovinem Proinsulin immunisierte Meerschweinchen produzieren zu je 50% AK_1 mit hoher Affinität gegen den Insulin- und den C-Peptidanteil sowie AK_2 mit geringer Affinität gegen den Insulinanteil (Lit.27). Da die C-Peptidmoleküle im Gegensatz zum Proinsulin als in sich gestreckte Zufallsketten vorliegen, ergibt sich daraus eine wesentlich geringere Antigenität: freies C-Peptid, das weder im Proinsulin spezifisch gefaltet gehalten noch an ein höhermolekulares Trägermolekül fixiert ist, wirkt nur schwach antigen (Lit.1).

Obwohl humanes, porcines und bovines C-Peptid in vielen Aminosäurenpositionen miteinander Übereinstimmen, reagieren die gegen das jeweilige C-Peptid gewonnenen Antikörper nicht miteinander kreuz (Lit.28). Es ist daher nicht möglich, gegen porcines oder bovines C-Peptid gewonnene Antikörper zur Bestimmung von humanem C-Peptid zu verwenden. Dies stimmt mit den von Yanaihara gefundenen Ergebnissen überein. Danach stellen die Aminosäurenpositionen 41 bis 43 des humanen Proinsulins (-Gln-Val-Glu-) eine spezifische antigene Determinante des sich von ihm abspaltenden C-Peptids dar (Lit.13). Beim porcinen C-Peptid aber finden sich an dieser Stelle die Aminosäuren Ala-Val-Glu, beim bovinen C-Peptid die Aminosäuren Ala-Leu-Gln. Da sich die Peptidmoleküle gerade an dieser Position wesentlich voneinander unterscheiden, wird ihr immunologisch unterschiedliches Verhalten um so verständlicher. Die Aminosäurenpositionen des Menschenaffen stimmen an dieser Stelle mit denen des Menschen überein (Lit.44).

Weiterhin erkannte Yanaihara, daß sowohl das C-terminale Ende des Proinsulins von Positionen 52 bis 63 als auch das N-termi-

nale Ende von Positionen 33 bis 36 des Proinsulins für die Bildung von C-peptidspezifischen Antikörpern von untergeordneter Bedeutung ist(Lit.13).

Dieser Befund war auch für die vorliegende Arbeit von grundlegender Bedeutung. Da nur die freie, nicht protonierte α -Aminogruppe am N-terminalen Ende des humanen C-Peptids analog zur Sangerschen Reaktion sich mit dem gelben 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol unter Bildung von gelbem 2,4-Dinitrophenylderivat umsetzt, bedeutet dies keine Blockierung möglicher Antigenloci im humanen C-Peptid(Lit.40).

A. II.5. Bisherige Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid

A. II.5.1. Allgemeines

Mit der Entwicklung des Radioimmunoassay(R I A) im Jahre 1960 durch Yalow und Berson (Lit.49) stand erstmals ein Bestimmungsverfahren für Peptide zur Verfügung, das die hohe immunologische Spezifität und die hohe Empfindlichkeit der Radiochemie miteinander verknüpfte. Da das C-Peptid keine bisher bekannte biologische Aktivität besitzt(Lit.44), kann es nur radiochemisch bestimmt werden. Hierfür stellen jedoch C-Peptidantikörper eine *conditio sine qua non* dar.

Da C-Peptid zur Zeit nur in sehr begrenztem Umfang zur Verfügung steht, muß ein Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid mit der geringstmöglichen Gesamtmenge an antigenem C-Peptid auskommen und dennoch einen möglichst hohen Titer an spezifischen C-Peptidantikörpern erzielen. Alle im folgenden genannten Autoren haben versucht, dieses Ziel zu erreichen.

A. II.5.2. Bisherige Untersuchungen

Melani(Lit.15) erzielte mit der Carbodiimid-Methode bei 1 Meer-schweinchen einen maximalen Antikörpertiter von 1:1000 (verfüg-bare Antigenmenge: 3mg C-Peptid).

Kaneko(Lit.32) erhielt einen maximalen Antikörpertiter von 1:7000. Heding(Lit.33) erzielte einen Titer von 1:100 bei einer Bindung an den Tracer von 62%. 1975 erzielte die gleiche Autorin bei höheren Antigenmengen einen Titer von maximal 1:3000. Faer (Lit.36) erzielte einen maximalen Antikörpertiter von 1:20 000 bei einer verfügbaren Antigenmenge von 200mg C-Peptid. Im glei-chen Jahre erzielte Beischer mit der Carbodiimid-Methode bei einer Ziege einen maximalen Titer an C-Peptidantikörpern von 1:150 000 (verwendete Antigenmenge: 0,1mg/kg KG/Injektion; ver-fügbare Gesamtmenge des Antigenes: 50mg humanes C-Peptid). Die Versuchsbedingungen und die Ergebnisse der genannten Autoren sind, soweit sie von ihnen publiziert wurden, in Tab. A II.1. einander gegenübergestellt worden.

A. II.6. Radioimmunologische Bestimmungsmethoden des C-Peptids

Da das C-Peptid keine bisher bekannte Stoffwechselaktivität etwa im Sinne eines meßbaren Substratumsatzes besitzt(Lit.44) und daher wahrscheinlich nur eine intramolekulare Haltefunktion des Insulins in der gemeinsamen Vorstufe Proinsulin wahrnimmt (Lit.30), kann zirkulierendes C-Peptid zur Zeit nur radio-immunologisch bestimmt werden. In der Literatur sind dazu eine Reihe von radioimmunologischen Testverfahren zur Bestimmung der Immunoreaktivität des C-Peptids(CPR) beschrieben worden (siehe Tab. A II.2.). Die dabei bestimmten C-Peptidkonzentrationen bei NÜchternen zeigen untereinander eine starke Variationsbreite. Dies ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß Antiseren mit ho-her unspezifischer Tracer-Verdrängung hohe C-Peptidwerte erge-ben. Die unspezifische Tracer-Verdrängung eines Antiserums vari-

iert überdies von Probe zu Probe, sodaß vorgeschlagen wurde (Lit.29), durch Austestung mehrerer C-Peptid-freier Proben eine durchschnittliche unspezifische Verdrängung zu ermitteln. Weiterhin ist anzunehmen, daß die Heterogenität des im Plasma auftretenden C-Peptids und die daraus möglicherweise resultierende unterschiedliche Immunreaktivität zusätzlich für den weiten Variationsbereich der in der Literatur mitgeteilten C-Peptidkonzentrationen verantwortlich ist (Lit.29). Der C-Peptidgehalt von Plasmaproben nimmt ferner bei Lagerung in Abhängigkeit von der Temperatur ab und ist in seiner Intensität von dem verwendeten Antiserum abhängig (Lit.6).

Caygill et al. versuchte daher, einen gemeinsamen Standard für den Vergleich der C-Peptidbestimmungen in verschiedenen Laboratorien zu finden. Da ihm jedoch keine ausreichenden Mengen an humanem C-Peptid zur Verfügung standen, verwendete er das in wässriger Lösung stabile 64-Formyllysine-C-Peptid. Dieser Standard erwies sich zwar als nützlich, jedoch reichte er allein nicht zum Ergebnisvergleich zwischen den verschiedenen Bestimmungsverfahren unterschiedlicher Spezifität aus, denn dazu war das zirkulierende C-Peptid-haltige Material der einzelnen Plasmaproben in sich zu heterogen (Lit.31).

Radioimmunologische Bestimmungsverfahren des C-Peptids wurden unter anderem von Melani (Lit.15), Kaneko (Lit.32), Heding (Lit.37) und Rainbow (Lit. 38) entwickelt. Einzelheiten sind aus Tab. A II.2. zu entnehmen.

B. Eigene Untersuchungen

B. I. Einleitung und Überblick

Die von Tager (Lit.2) am Glucagon beschriebene Methode zur Kopplung des Haptens an Rinderalbumin über das im Überschuß vorhandene 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde zunächst an dem in ausreichender Menge zur Verfügung stehenden Schweineinsulin versuchsweise nachvollzogen (B. II.1. - 2.5.3.). Das an Rinderalbumin gekoppelte Schweineinsulin wurde einer physikalisch-chemischen Untersuchung unterzogen (B. III.1. - 4.7.). Weiterhin wurde dieses Vollantigen nach Homogenisierung mit Freundschem Adjuvant im äquimolaren Verhältnis (B. II.3.1 - 3.4.) neun Meer-schweinchen injiziert (B. IV.1. - 6.); in vierzehntägigem Abstand erfolgten weitere Boosterungen mit diesem Antigen. Der dabei erzielte Antikörpertiter wurde im Radioimmunoassay bestimmt (B. V.1.1. - 2.3.2.).

Anschließend wurde 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol zunächst unter Verwendung von porcinem C-Peptid synthetisiert (B. VI.1. - 3.5.3.). Die physikalisch-chemische Untersuchung des Syntheseproduktes wurde in B. VII.1. - 3.8. durchgeführt.

Im Hauptversuch endlich erfolgte die Kopplung von humanem C-Peptid an Rinderalbumin mit der Difluoro-Dinitrobenzol-Methode (B. VIII.1.1. - 3.4.). Nach Homogenisierung mit Freundschem Adjuvant wurde das humane C-Peptid sechs Kaninchen in vierzehntägigem Abstand insgesamt viermal injiziert (B. IX.1. - 6.). Der dabei erzielte Antikörpertiter wurde im Radioimmunoassay bestimmt (B. X.1.1. - 2.2.2.).

Eine physikalisch-chemische Untersuchung des an Rinderalbumin gekoppelten humanen C-Peptids konnte wegen Substanzmangels nicht durchgeführt werden; strukturelle und chemische Gemeinsamkeiten des porcinen und des humanen C-Peptids erlauben jedoch Rückschlüsse hinsichtlich der Bindungseigenschaften des Peptids an

das Rinderalbumin (Abb. B. VI.1.).

B. II. Versuch der laborchemischen Synthese von 1-Insulinyl-
-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol nach der Methode von
H.S.Tager unter Verwendung von Schweineinsulin (Lit.39)

B. II.1. Reagentien und Instrumente

B. II.1.1. Reagentien

Kristall-Insulin vom Schwein, 1mg $\pm$ 27 I.E.

Op. 050865 Hoechst AG, Frankfurt-Hoechst

Serum-Albumin vom Rind reinst für
wissenschaftliche Untersuchungen
Behringwerke AG, Marburg (DRHD 196 02991)

1,3-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol 19520

Serva Entwicklungslabor, Heidelberg

Guanidiniumchlorid für biochemische Zwecke

Art. 4219 E.Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse (kristall.)

Art. 4873 E.Merck, Darmstadt

di-Natriumtetraborat zur Analyse

Art. 6308 E.Merck, Darmstadt

Methanol zur Analyse

Art. 6009 E.Merck, Darmstadt

Diäthyläther zur Analyse

Art. 921 E.Merck, Darmstadt

1 N Natronlauge

Art. 9137 E.Merck, Darmstadt

Essigsäure min 96% (etwa 1,05)°

Art. 62 E. Merck, Darmstadt

Siliconlösung Serva 35130

Serva Feinbiochemica, Heidelberg

B. II.1.2. Glaswaren

7ml Zentrifugengläser mit spitzkonischem Boden

Reagenzgläser

Jodzahlkolben

Erlenmeyerkolben

3ml Vollpipette

1ml Meßpipette

Pasteurpipette mit Ansaugbällchen

100ml Meßzylinder

B. II.1.3. Meßgeräte

Analysenwaage (Meßbereich: 0,01g bis 1000g)

Typ 2254, Sartorius-Werke GmbH, Göttingen

Analysenwaage (Meßbereich: 0,000 01g bis 100g)

Typ 2444, Sartorius-Werke GmbH, Göttingen

pH Meter H 3 Beckman^R

Thermometer (Meßbereich: -20°C bis +40°C)

B. II.1.4. Weitere Elektrogeräte

Trockenschrank Typ RB 360

Heraeus GmbH, Hanau

Cryofuge 6 - 6 Heraeus Christ
Heraeus GmbH, Hanau

Rotationsverdampfer
Büchi Glaswarenfabrik Flawil, Schweiz

Magnetrührer IKA-Combimag RCO

Vortex-Mixer, Typ REAX 1DR Heidolph

Kühlschrank (Innentemperatur: $+4^{\circ}\text{C}$)

Gefriertruhe (Innentemperatur: -80°C)

B. II.1.5. Sonstiges

Stickstoffgebläse

Peleusball

Eppendorfpipetten

Mikrospatel

Laboratoriumsspatel

Glovex^R Vinylhandschuhe

Stoppuhr

Demineralisator, Seradest SD 3000

Seral, Ransbach-Baumbach

Gewerbesalz

Anmerkung: Die Namensbezeichnungen sowie die Maßeinheiten
der verwendeten Reagentien und Instrumente ent-
sprechen den Angaben des jeweiligen Herstellers.

9. II.2. Versuchsaufbau zur laborchemischen Synthese von
1-Insulinyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol

8. II.2.1. Herstellung von 100ml Guanidin-Phosphatpuffer,
pH 7,2

In einem Erlenmeyerkolben wurden nacheinander 0,01 Mol ($\hat{=}$ 1,36g) Kaliumdihydrogenphosphat sowie 0,7 Mol ($\hat{=}$ 66,85g) Guanidiniumchlorid auf einer Analysenwaage eingewogen. 30ml demineralisiertes Wasser wurden hinzugegossen und der Erlenmeyerkolben auf ca. 40°C erwärmt, um die Salze vollständig im Wasser lösen zu können. Nachdem sich der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wieder auf Raumtemperatur abgekühlt hatte, wurde die Lösung ca. 15 Minuten lang mit einem Magnetrührer durchmischt und anschließend ihr pH-Wert an der Glaselektrode eines pH-Meters mit 3,7 bestimmt. Etwa 9 bis 14 Milliliter einer ca. 1 M Natronlauge mußten hinzupipettiert werden, um den gewünschten pH-Wert von 7,2 zu erhalten. Die unterschiedliche Menge an benötigter Natronlauge läßt sich mit der CO₂-Aufnahme der Lauge aus der Raumluft erklären. Anschließend wurde mit Aqua demineralisata auf 100ml aufgefüllt.

Aufbewahrung: verschlossen bei +4°C

8. II.2.2. Herstellung von 0,1ml Insulinpufferlösung

Ein 7ml Zentrifugenglas mit spitzkonischem Boden wurde mit Siliconlösung benetzt und diese Lösung etwa 1 Stunde lang bei 100°C im Trockenschrank eingebrannt. Diese Siliconisation sollte ein unnötiges Haften von Substanzen und Reaktionsprodukten an der Innenseite des Reagenzglases verhindern. 1mg kristallisiertes Schweineinsulin wurde mittels Mikrospatel in das auf Raumtemperatur abgekühlte, siliconisierte Zentrifugenglas gegeben. Aus einer Eppendorfpipette wurden 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 hinzupipettiert. Mit einem Vortex-Mixer wurde aufgewirbelt, sodaß sich das Schweineinsulin besser in dem Puffer lösen

konnte. Die Pufferlösung verblieb wasserklar, und auch nach zehnminütiger Zentrifugation des Ansatzes bei 23°C und 3000 U/min befand sich keine feste Insulinphase am Boden des Zentrifugenglases; eine alleinige Suspension des Schweineinsulins im im Puffermedium war damit ausgeschlossen worden.

B. II. 2.3. Herstellung einer 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol-
lösung (30mg/ml gereinigtem Methanol)

20ml Methanol wurden in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe!) bei 60°C destilliert. Damit sollte versucht werden, in dem Methanol noch befindliche Verunreinigungen abzutrennen. Die hierfür verwendeten Rotationskolben sowie die Destillationsvorrichtung wurden zuvor mehrmals mit Methanol durchgespült. Die destillierte Methanolmenge wurde bis zu ihrer Verwendung kurzfristig in braunen Glasflaschen verschlossen aufbewahrt, um eine Oxidation zu vermeiden.

90mg 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol wurden in ein Glasröhrchen eingewogen. 3ml destilliertes Methanol wurden aus einer Vollpipette hinzupipettiert. Leichtes Schütteln des Reagenzglases auf einem Vortex-Mixer genügte zur vollständigen Auflösung der Substanz im Methanol. Zum Pipettieren wurde ein Peleusball verwendet, zur Einwaage wurden Gummihandschuhe getragen, denn entsprechend der chemischen Struktur des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols handelt es sich dabei um eine potentiell kanzerogene Substanz.

B. II.2.4. Aktivierung des Schweineinsulins mittels 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol in methanolischer Lösung

B. II.2.4.1. Vorbereitende Maßnahmen

Über einen Rotationverdampfer wurden unter Vakuum bei 35°C etwa 50ml Diäthyläther destilliert. Dadurch sollten noch vorhandene Verunreinigungen, vor allem Peroxide sowie eventuelles Restwasser vom Diäthyläther abgetrennt werden. Die bei der Destillation verwendeten Rotationskolben sowie die übrigen gläsernen Bestandteile des Destillationsapparates wurden vorher mehrfach mit Diäthyläther durchgespült. Die destillierte Diäthyläthermenge wurde zur Vermeidung einer Peroxidbildung bis zu ihrer Verwendung in braunen Glasflaschen verschlossen aufbewahrt.

In einem 1000ml Becherglas wurde eine Mischung aus Eis und Gewerbesalz hergestellt; die darin gemessene Temperatur lag bei -17°C.

B. II.2.4.2. Aktivierung und sukzessive Ätherextraktion

0,5 ml der nach B. II.2.3. hergestellten methanolischen Lösung des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols wurden aus einer 1ml Meßpipette mittels Peleusball zu den 0,1ml der vorbereiteten Insulinpufferlösung (vergleiche B. II.2.2.) pipettiert, die dabei entstandenen Phasen auf einem Vortex-Mixer miteinander vermischt und der gesamte Ansatz 15 Minuten lang offen bei Raumtemperatur (23°C) stehen gelassen; dabei sollte unter Abspaltung von Fluorwasserstoff die Bildung von 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol ermöglicht werden.

Nach fünfzehnminütiger Reaktionszeit wurde der Ansatz etwa 1 Minute lang in dem vorbereiteten Eis/Salzgemisch bei -17°C gekühlt und anschließend wurden 2,4ml eisgekühlter Diäthyläther hinzugefügt. Die 2,4ml Diäthyläther entsprechen dem vierfachen

Volumenanteil des Reaktionsansatzes. Beide Phasen wurden auf einem Vortex-Mixer heftig miteinander vermischt und der Ansatz 5 Minuten lang bei 0°C und 1000 U/min zentrifugiert. Die obere Ätherphase wurde in eine Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Weiter 1,8ml eisgekühlter Diäthyläther, entsprechend dem dreifachen Volumenteil, wurden der unteren Phase hinzugefügt. Die beiden entstandenen Phasen wurden erneut auf einem Vortex-Mixer miteinander vermischt und der Ansatz weitere 5 Minuten bei 0°C und 1000 U/min zentrifugiert. Die obere Ätherphase wurde mittels Pasteurpipette abgesaugt und verworfen; 6ml frischer, eisgekühlter Diäthyläther wurden hinzugegossen. Der Ansatz wurde 1 Minute lang in das Eis/Salzgemisch gestellt, ehe die Ätherphase wieder mittels Pasteurpipette abgesaugt wurde. Der verbliebene gelbe Niederschlag wurde an einem Stickstoffgebläse sorgfältig getrocknet (Lit.39).

Der verwendete Diäthyläther war mit einer 10ml Maßpipette in mehrere Reagenzgläser pipettiert und in dem vorbereiteten Eis/Salzgemisch bei -17°C gekühlt worden. Zum Pipettieren wurde ein Pelleusball verwendet.

B. II.2.5. Kopplungsversuch von Schweineinsulin an Rinderalbumin

B. II.2.5.1. Herstellung von 100ml 0,1 Mol/l Boratpuffer, pH 10,0

0,01 Mol ($\approx 3,813\text{g}$) di-Natriumtetraborat wurden in einem Erlenmeyerkolben eingewogen. 60ml demineralisiertes Wasser wurden hinzugegossen und der Inhalt des Erlenmeyerkolbens in einem Wasserbad von 80°C erhitzt. Nur dadurch konnte das Borsalz in Lösung gebracht werden. Teilweise fielen auch beim vorsichtigen Abkühlen der Lösung einzelne Boratkristalle wieder aus und mußten durch erneutes Erhitzen in Lösung gebracht werden. Nachdem sich die Lösung auf Raumtemperatur (23°C) abgekühlt hatte, ergab die pH-Wertbestimmung einen pH von 9,7. Durch die Zugabe

von 4 bis 6 Milliliter einer ca. 1 M Natronlauge wurde der gewünschte pH-Wert von 10,0 erreicht. Weitere Zufuhr von demineralisiertem Wasser ergab ein Endvolumen von 100ml Boratpuffer, ohne daß sich jedoch dabei der pH-Wert meßbar änderte.

Aufbewahrung: verschlossen bei +4°C.

B. II.2.5.2. Herstellung von 1ml Albuminpufferlösung

10mg Rinderalbumin wurden auf einer Analysenwaage in ein Reagenzglas eingewogen; anschließend wurde 1ml 0,1 M Boratpuffer, pH 10 mittels Eppendorfpipette hinzugefügt. Das Reagenzglas wurde geschüttelt und das Rinderalbumin dadurch vollständig in dem Puffer gelöst. Die dabei aufgetretene Schaumbildung bedingt durch eine Änderung der Oberflächenspannung durch das Albumin konnte durch kurzes Zentrifugieren der Lösung bei 3000 U/min beseitigt werden.

B. II.2.5.3. Peptidkopplung

0,1ml Rinderalbuminpufferlösung wurden mittels Eppendorfpipette dem in B. II.2.4.2. hergestellten Produkt, das in Form eines gelben Niederschlages vorlag, hinzupipettiert. Es handelte sich dabei um das 1-Insuliny-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol sowie um die bei dessen Synthese benötigten Salze. Weder vor noch nach dem Vermischen der beiden Phasen gelang es, den gesamten Niederschlag in der Rinderalbuminlösung aufzulösen. Auch nach Zufuhr von 0,05ml oder 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 war dies nicht möglich.

Der Ansatz wurde etwa 10 Minuten lang unter dem Abzug stehen gelassen, um das Verdampfen von Restäther zu gewährleisten. Anschließend wurde der Ansatz mit Aluminiumfolie zugedeckt und im Dunkeln bei Raumtemperatur (23°C) 24 Stunden lang aufbewahrt; innerhalb dieses Zeitraumes sollte es zur Bildung von 1-Insu-

linyl-S-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol kommen. Das nach Beendigung dieses Zeitraumes entstandene Produkt lag in zwei Phasen vor: Am Boden des Reagenzglases erkannte man einen festen, gelben Niederschlag, über dem sich eine ebenfalls gelbe Flüssigkeitsphase befand. Nachdem das Reagenzglas etwa 5 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert worden war, erschien die vorher trübe Flüssigkeitsphase nun klar und durchscheinend, hatte jedoch ihre gelbe Farbe behalten.

Das Reagenzglas mit dem Reaktionsprodukt wurde in der Gefriertruhe bei -80°C tiefgefroren und somit für die Tierversuche konserviert. Für die physikalisch-chemischen Untersuchungen wurde das gerade synthetisierte Derivat direkt weiterverwendet.

8. II.2.6. Reaktionsmöglichkeiten des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol mit porcine Insulin

1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol reagiert im alkalischen Milieu unter Abspaltung von Fluorwasserstoff mit der nicht-protonierten, freien N⁺-terminalen Aminogruppe von Peptiden zu 1-Peptidyl-S-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol (Lit.40). Wie durch Harris und Stahl bei den Na⁺- und K⁺-ATPasen gezeigt werden konnte, reagiert 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol analog dazu auch mit der Thiol-Gruppe der Aminosäure Cystein (Lit.41). Nach Deyev reagiert 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol darüber hinaus auch mit der ε-Aminogruppe der Aminosäure Lysin (Lit.42). Golds und Braun beschrieben weiterhin das Reaktionsvermögen des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols mit Tyrosinhydroxyl-, Sulfhydryl- und Imidazolgruppen (Lit.43).

Nach diesen beschriebenen Reaktionsmöglichkeiten kann das 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol mit dem porcine Insulin an dessen nicht-protonierter, freier N⁺-terminaler Aminogruppe zum 1-Insulinyl-S-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol reagieren. Weiterhin kann das porcine Insulin aber auch mit jeder seiner fünf Tyrosin-

hydroxylgruppen sowie mit der ϵ -Aminogruppe der beiden Lysinmoleküle reagieren. Dadurch wird das porcine Insulin an bis zu sieben weiteren Positionen seiner Aminosäuresequenz mit 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol aktiviert, die ihrerseits bei der Synthese des 1-Insuliny1-5-Albuminy1-2,4-Dinitrobenzols an Albumin gekoppelt werden können, es sei denn, daß eine sterische Behinderung dem entgegen wirkt.

Die anschließende Kopplung des porcinen Insulins an das Rinderalbumin nach B. II.2.5.3. erfolgt am C₅-Atom des Benzolringes im 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol unter Abspaltung der zweiten Fluorgruppe als Fluorwasserstoff. Die Reaktionsmöglichkeiten an dieser zweiten Fluorgruppe mit dem Rinderalbumin entsprechen dem in Lit. 40-43 Gesagten.

B. II.3. Herstellung eines Insulinimpfstoffes zur Immunisierung von 9 Meerschweinchen

B. II.3.1. Allgemeines

9 Meerschweinchen erhielten bei der 1. und 2. Immunisierung lediglich den in 0,05ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 löslichen Anteil des in B. II.2.5.3. synthetisierten Insulinderivates. Da es dabei zu keiner Antikörperbildung kam (vergleiche dazu B. V. 2.1.1.), wurde den Meerschweinchen bei der 3. bis 5. Immunisierung die Gesamtmenge des Insulinderivates injiziert. Dazu wurde das Insulinderivat aufgrund seiner unvollständigen Löslichkeit in 0,1 M Boratpuffer, pH 10 nach B. II.3.3.2. physikalisch aufbereitet.

B. II.3.2.1. Materialien

Becherglas

Zentrifuge

Eppendorfpipetten

Dialysierschlauch, Visking Tubing, Union Carbide

Multiple Dialyzer

Ludwig Hormuth, Heidelberg-Wiesloch

Rotationsverdampfer

Reduzierstück

Gefriertruhe

Lyophilisator von Martin Christ

Typ 1102, Osterode

Lichtmikroskop, Carl Zeiss Nr. 2089874

10ml Spritzen, Injekt Luer, E.Braun, Melsungen AG

Medoject Luer, Nr. 1, 90mm x 40mm

Verschlußstopfen von Monovetten

Art. 920, Walter Sarstedt, Laborartikel

Mikrohomogenisator, Ultra-Turrax^R,

Typ Tp 18/10 mit Thyristor Regler

von Janke & Kunze AG, Staufen i. Breisgau

Mikrospatel

B. II.3.2.2. Reagentien

Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 (vergleiche B. II.2.1.)

7 M Harnstofflösung (vergleiche B. III.4.1.3.)

0,1 M Essigsäure

demineralisiertes Wasser

Freund's Adjuvant (complete) R 096013

Grand Island Biological, Company Grand Island N.Y. USA

Freund's Adjuvant (incomplete) A 196122

Grand Island Biological, Company Grand Island N.Y. USA

Kochsalzlösung 0,9%, Pharma Hameln, Hameln/Weser

synthetisiertes Insulinderivat (vergleiche B. II.2.5.3.)

B. II.3.3.1. Gewinnung der zur 1. und 2. Immunisierung von Meerschweinchen verwendeten Menge an Insulinderivat aus dem in B. II.2.5.3. synthetisierten Produkt

Das bei -80°C tiefgefrorene Insulinderivat wurde in einem mit Leitungswasser gefüllten Becherglas aufgetaut. 0,05ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 wurden hinzupipettiert, das Reagenzglas geschüttelt und bei 23°C 5 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert. Der klare, lösliche gelbe Überstand wurde sorgfältig mit einer Eppendorfpipette angesaugt und direkt zur Homogenisierung in B. II.3.4. weiterverwendet.

B. II.3.3.2. Physikalische Aufbereitung der zur 3. bis 5. Immunisierung verwendeten Gesamtmenge an Insulinderivat

B. II.3.3.2.1. Allgemeines

Auch nach Zugabe von 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 oder von 0,1ml 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) ließ sich das Insulinderivat nicht vollständig lösen. Durch Separation des Niederschlages und erneutem Versetzen mit Guanidin-Phosphatpuffer oder mit Harnstofflösung gingen jedoch weitere Mengen in Lösung (vergleiche dazu auch B. III.1.1. - 1.2.). Es erschien daher sinnvoll, durch geeignete physikalische Maßnahmen, die im folgenden dargestellt sind, die Löslichkeitseigenschaften des Insulinderivates zu verbessern.

B. II.3.3.2.2. Dialyse des Insulinderivates

Ein etwa 20cm langer Dialysierschlauch wurde an einem Ende zweifach verknotet und mit eben diesem Ende in die Öffnung eines Glastrichters geschoben, der über ein Becherglas in Mittelstel-

lung gehalten werden konnte (vergleiche Abb. B. II.3.1.). Aufgetautes Insulinderivat wurde fraktionsweise mit insgesamt 10ml 7 M Harnstofflösung versetzt und konnte somit in den Dialysierschlauch überführt werden; daraufhin wurde auch das noch unverschlossene Ende des Dialysierschlauches fest verknotet. In dem Multiple Dialyzer wurde das Insulinderivat gegen 5 Liter 0,1 M Essigsäure 24 Stunden lang dialysiert. Durch das saure Milieu der Essigsäure sollte die Löslichkeit des Insulinderivates noch weiter verbessert werden. Ein geringer, lichtmikroskopisch amorpher, gelber Niederschlag verblieb dennoch am Boden des verknoteten Dialysierschlauches (vergleiche dazu Abb. B. II.3.2.).

Bei der Dialyse konnten Harnstoff, Guanidinchlorid, Borax sowie weitere niedermolekulare Bestandteile entfernt werden.

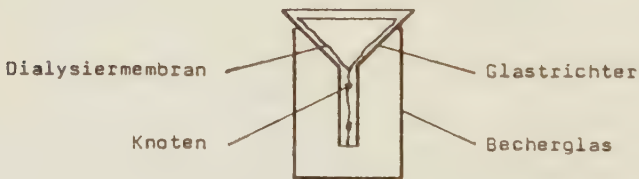


Abb. B. II.3.1.: Zur Dialyse des Insulinderivates über Glas-
trichter und Becherglas fixierter, verknoteter Dialysierschlauch

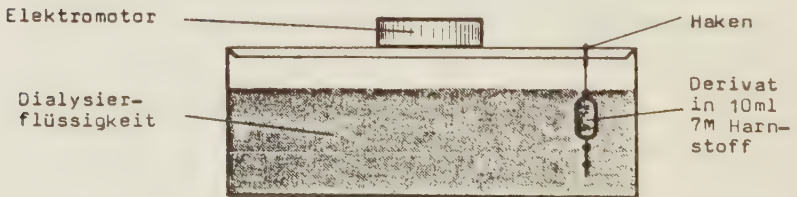


Abb. B. II.3.2.: Multiple Dialyzer mit Dialysierschlauch
gefüllt mit Insulinderivat

B. II.3.3.2.3. Eindampfen des Insulinderivates

5ml des dialysierten, in Wasser gelösten, gelben, klaren Insulinderivates wurden in ein Glasröhrchen mit Schliff pipettiert und mittels Reduzierstück am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur und Unterdruck (Wasserstrahlpumpe!) auf ein Volumen von ca. 2ml eingedampft.

Die in dem Dialysierschlauch verbliebenen 5ml des gelösten Insulinderivates sowie der amorphe Niederschlag wurden in ein zweites Glasröhrchen mit Schliff überführt und am Rotationsverdampfer in gleicher Weise auf ein Volumen von etwa 1ml eingedampft.

B. II.3.3.2.4. Lyophilisation des Insulinderivates

Die in dem zweiten Glasröhrchen nach B. II.3.3.2.3. auf ein Volumen von 1ml eingedampfte Menge an Insulinderivat wurde bei -80°C tiefgefroren und anschließend 48 Stunden lang in einem Lyophilisator getrocknet.

B. II.3.3.2.5. Gewinnung der zur 3. bis 5. Immunisierung verwendeten Menge an Insulinderivat aus dem nach B. II.2.5.3. erhaltenen Produkt

Der nach B. II.3.3.2.4. lyophilisierte Anteil des dialysierten Insulinderivates löste sich spontan in den 2ml der klaren, gelben Lösung an Insulinderivat des ersten Glasröhrchen auf (vergleiche dazu B. II.3.3.2.3.). Es ergab sich ein Gesamtvolumen von ca. 2,5ml, das sofort zur Emulgierung weiterverwendet wurde (siehe auch B. II.3.4.). Ließ man diesen Ansatz jedoch länger als eine Stunde stehen, so trat erneut ein gelber, lichtmikroskopisch amorpher Niederschlag auf, der durch Reaggregation entstanden war.

B. II.3.4. Emulgierung des Insulinderivates mit Freundschem Adjuvant

Die nach B. II.3.3.1. oder B. II.3.3.2. gewonnene Menge an Insulinderivat wurde auf zwei 10ml Spritzen, die an ihrem Kanülenansatzstück mit je einem Monovettenverschlußstopfen verschlossen worden waren, zu gleichen Teilen aufgeteilt. In jede der beiden Spritzen wurde 0,9% NaCl-Lösung bis zu einem Gesamtvolumen von 2,5ml pipettiert und anschließend 2,5ml Freundsches Adjuvant hinzugefügt. Zur 1. und 3. Immunisierung wurde komplettes, zu allen weiteren Boosterungen inkomplettes Freundsches Adjuvant verwendet. Das mit abgetöteten Tuberkelbakterien versehene komplette Freundsches Adjuvant sollte das Immunsystem der Meer-schweinchen stimulieren. Da bei der 1. und 2. Immunisierung die zur Antikörperbildung erforderliche Antigenmenge nicht erreicht worden war (vergleiche dazu B. V.2.1.2.), mußte bei der 3. Immunisierung gleichermaßen von vorn begonnen werden, sodaß hierbei erneut komplettes Freundsches Adjuvant benutzt wurde.

Das somit auf zwei Spritzen verteilte Insulinderivat wurde jeweils ca. 2 Minuten lang mit einem Mikrohomogenisierstab emulgiert. Dabei wurde insbesondere durchrhythmisches Anheben und Senken des Mikrohomogenisierstabes auf eine gleichmäßige Verteilung des in der entstehenden weißen Emulsion befindlichen Insulinderivates geachtet. Der Mikrohomogenisierstab wurde aus der Spritze herausgezogen und an ihm noch haftende, visköse Emulsion mit einem Mikrospatel an der Innenseite beider Spritzen abgestreift; somit wurden die Verluste reduziert (siehe auch Abb. B. II.3.4.).

Jede der beiden Spritzen wurde mit dem dazugehörigen Kolben verschlossen und die jeweilige Spritze mit ihrer Monovettenkappe senkrecht nach oben zeigend gehalten; die visköse Emulsion floß dabei nur langsam kolbenwärts. Die Monovettenkappe wurde abgehoben und eine Kanüle mit ihrer Metallspitze in die jeweilige Spritze geschoben. Der Spritzenkolben wurde nun vorsichtig

in das Spritzenlumen vorgeschoben. Beim Einrasten des Kolbens in der Spritze entwich ruckartig Luft durch die Metallkanüle, jedoch (fast) keine Emulsion (siehe Abb. B. II.3.5.). Die Kanüle wurde entfernt und der Kolben bis zur 5ml Markierung vorgeschoben. Somit ergab sich (fast) kein Substanzverlust. Sofort danach wurde diese Emulsion zur Immunisierung der 9 Meerschweinchen verwendet.

Abb. B.II.3.3.:

10ml Spritze mit Insulinderivat, 0,9 % NaCl-Lösung und Freundschem Adjuvant

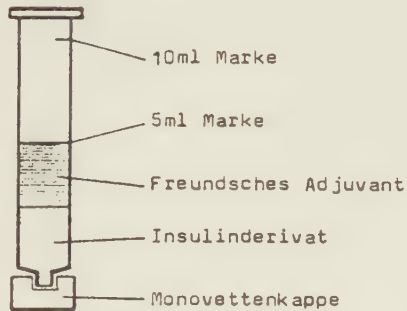


Abb. B.II.3.4.:

Emulgierung

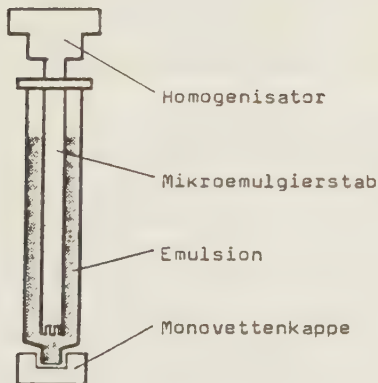
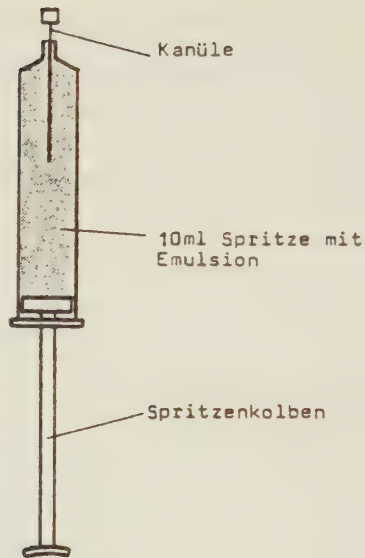


Abb. B.II.3.5.:

Vorbereitung der Injektions-
spritze zur Immuni-
sierung



B. III. Physikalisch-chemische Untersuchung des 1-Insulinyll- -5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols

B. III.1. Allgemeine Vorbemerkung

Zur näheren Klassifizierung der nach B. II.2.4.2. und nach B. 2.5.3. synthetisierten Insulinderivate wurden diese zunächst auf ihre Löslichkeitseigenschaften hin untersucht. Da es jedoch bei keinem der verwendeten Lösungsmitteln zu einem vollständigen Auflösen des jeweiligen Insulinderivates gekommen war, wurde der verbliebene Niederschlag lichtmikroskopisch untersucht. Weiterhin wurde unter Anwendung radiochemischer Methoden die Löslichkeit des 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in den verschiedenen Medien quantitativ erfaßt. Gelchromatographische und spektralphotometrische Untersuchungen, die mit der Kopplung des

1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols an die Aminosäure Glycin verbunden waren, sollten Rückschlüsse auf Struktur und etwaige Größe des entstandenen Insulinderivates ermöglichen.

B. III.1.1. Löslichkeitsverhalten der synthetisierten Insulin-
derivate

B. III.1.1.1. Löslichkeitsverhalten des 1-Insulinyll-5-Fluoro-
-2,4-Dinitrobenzols

B. III.1.1.1.1. Materialien

Eppendorfpipetten

Vortex-Mixer

Zentrifuge

Reagenzgläser

B. III.1.1.1.2. Reagentien

1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol (vergleiche B. II.2.4.2.)

1-Insulinyll-5-Albuminyll-2,4-Dinitrobenzol (vergl. B. II.2.5.3.)

Boratpuffer, pH 10,0 (vergleiche B. II.2.5.1.)

7M Harnstofflösung, pH 8,4 (vergleiche B. III.4.1.3.)

B. III.1.1.1.3. Löslichkeit des nach B. II.2.4.2. synthetisier-
ten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in
Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2

Der nach Ätherextraktion in B. II.2.4.2. verbliebene gelbe Niederschlag, bestehend aus 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol, Guanidiniumchlorid und anderen im Reaktionsgemisch vorhandenen Salzen, wurde mit 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 versetzt. Der Ansatz wurde heftig geschüttelt, ohne daß sich jedoch dabei

der gelbe Niederschlag völlig in dem Lösungsmittel auflöste; es trat lediglich eine geringe Gelbfärbung des zuvor wasserklaren Puffers ein, die auch nach fünfminütiger Zentrifugation bei 3000 U/min und 23°C bestehen blieb. Am Boden des Reagenzglases befand sich somit weiterhin der gelbe Niederschlag, der nun von einer klaren, hell-gelben Flüssigkeitsphase bedeckt wurde. Daraus war ersichtlich, daß sich das 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol nur zu einem geringen Teil im Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 gelöst hatte (vergleiche dazu auch 8. III. 3.1. - 8. III.3.5.).

8. III.1.1.1.4. Löslichkeit des nach 8. II.2.4.2. synthetisierten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in Boratpuffer, pH 10,0

Der nach Ätherextraktion in 8. II.2.4.2. verbliebene gelbe Niederschlag wurde mit 0,1ml Boratpuffer, pH 10,0 versetzt. Der Ansatz wurde geschüttelt und 5 Minuten lang bei 23°C und 3000 U/min zentrifugiert. Mit Ausnahme einer geringen Gelbfärbung des Puffers, wie sie auch in 8. III.1.1.1.3. eingetreten war, kam es im 0,1 M Boratpuffer zu keiner Auflösung des 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols.

Die flüssige Phase wurde mit einer Eppendorfpipette aufgesaugt und zur gelchromatographischen sowie spektralphotometrischen Untersuchung aufbewahrt (vergleiche 8. III.3.5. sowie 8. III. 4.2.).

8. III.1.1.1.5. Löslichkeit des nach 8. II.2.4.2. synthetisierten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in 0,1ml 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungeeuffert)

Der nach Ätherextraktion in 8. II.2.4.2. verbliebene gelbe Niederschlag wurde mit 0,1ml 7 M Harnstofflösung versetzt. Der An-

satz wurde geschüttelt und 5 Minuten lang bei 23°C und 3000 U/min zentrifugiert. Dabei trat ebenso wie in B. III.1.1.1.3. oder in B. III.1.1.1.4. nur eine geringe Gelbfärbung des Lösungsmittels ein, ohne daß sich der gelbe Niederschlag darin völlig aufgelöst hatte. Die flüssige Phase mit einem Gesamtvolumen von etwa 0,1ml wurde in ein Reagenzglas zur gelchromatographischen und spektralphotometrischen Untersuchung abpipetiert (vergleiche B. III.4.3.).

8. III.1.1.1.6. Löslichkeit des nach B. II.2.4.2. synthetisierten 1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in insgesamt 0,2ml 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert)

Ein nach B. II.2.4.2. synthetisiertes Insulinderivat wurde nach B. III.1.1.1.5. mit 0,1ml 7 M Harnstofflösung versetzt. Der Restniederschlag wurde ebenfalls mit weiteren 0,1ml 7 M Harnstofflösung versetzt, geschüttelt und 5 Minuten lang bei 23°C und 3000 U/min zentrifugiert. Nun wurde die flüssige, gering gelbe Phase zu einer nach B. III.1.1.1.5. hergestellten Lösung hinzugegossen. Die somit entstandene Lösung hatte ein Endvolumen von 0,2ml und wurde ebenfalls gelchromatographisch und spektralphotometrisch untersucht (vergleiche B. III.4.4.).

8. III.1.1.2. Löslichkeit des mit Rinderalbumin versetzten 1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols

Das nach B. II.2.5.3. synthetisierte Insulinderivat löste sich nur teilweise in 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2; auch in 0,1ml 7 M Harnstofflösung oder in 0,1ml 0,1 M Boratpuffer, pH 10,0 war das Derivat nur teilweise löslich. Der verbliebene Niederschlag wurde daher in B. III.2.3. lichtmikroskopisch auf seine Morphologie hin untersucht. Das mit 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 versetzte Derivat wurde 5 Minuten lang bei

23°C und 3000 U/min zentrifugiert und nach B. III.4.5. gelchromatographiert und photometriert.

9. III.2. Mikroskopische Untersuchung

6. III.2.1. Materialien

Mikrospatel

Objektträger

Deckblättchen

Pasteurpipette

Lichtmikroskop, Carl Zeiss

0,9% NaCl-Lösung

8. III.2.2. Lichtmikroskopische Untersuchung des nach B. III.

1.1.1.4. in Boratpuffer, pH 10,0 unlöslichen An-
teiles an 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol

Der in Boratpuffer, pH 10,0 unlösliche Anteil des nach B. II. 2.4.2. synthetisierten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols wurde mit einem Mikrospatel auf einen Objektträger überführt. Ein Tropfen physiologische Kochsalzlösung wurde hinzupipettiert und mit einem Deckblättchen überschichtet. Die lichtmikroskopische Betrachtung bei 320facher Vergrößerung ließ neben transparenten, ungefärbten, kristallinen Strukturen auch zahlreiche gelbe, amorphe Massen erkennen.

8. III.2.3. Lichtmikroskopische Untersuchung des unlöslichen, mit Rinderalbumin versetzten 1-Insulinyll-5-Fluoro- -2,4-Dinitrobenzols

Die Untersuchung wurde wie in B. III.2.2. beschrieben durchgeführt; hinsichtlich des Ergebnisses fand sich hierbei kein Unterschied.

B. III.2.4. Beurteilung

Die transparenten, farblosen, kristallinen Strukturen entsprechen am ehesten den als Puffer zur Synthese des 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols verwendeten Salzen. Dabei deutet die grün-gelbe Verfärbung der blauen Bunsenbrennerflamme auf das Auftreten von Borat hin. Die gelben, amorphen Massen hingegen stellen unlösliches, derivatisiertes Insulin dar; die gelbe Farbe ist hierbei durch das 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol, die Formlosigkeit durch den Proteinanteil (Insulin) bedingt.

B. III.3. Radiochemische Bestimmung des Bindungsanteiles mittels 125-Jod-Insulin

B. III.3.1. Materialien

γ-Szintillationszähler: Nuclear Enterprise NE 1600
Data Dynamics 390

PPN-Röhrchen, Art.Nr. 115201

Greiner, Labortechnik, Nürtingen

0,1ml Eppendorfpipetten

B. III.3.2. Reagentien

0,05ml 125-Jod-Insulinlösung, Behring-Werke, Frankfurt/Main,
spezifische Aktivität: ca. 20 000 Imp./min

B. III.3.3. Durchführung

In eine 0,1ml Eppendorfpipette wurden 0,05ml einer 125-Jod-Insulinlösung je zweimal angesaugt und erneut zurückpipettiert. Damit sollte die Innenseite des Pipettenansatzstückes mit einem dünnen Film von 125-Jod-Insulinlösung benetzt werden. Eine nach

B. II.2.2. hergestellte Insulinpufferlösung wurde vollständig in dieses Pipettenansatzstück angesaugt. Dabei vermischte sich das unmarkierte Insulin mit dem 125-Jod-Insulin. Die gesamte Insulinpufferlösung wurde nun in ein PPN-Röhrchen pipettiert und die darin meßbare Aktivität an 125J in einem γ -Szintillationszähler mit 54 028 Imp./min bestimmt. Die Insulinpufferlösung mit dem 125J-markierten Anteil wurde in ein Reagenzglas zurückpipettiert und die in dem PPN-Röhrchen und dem Pipettenansatzstück verbliebene Restaktivität mit 3 052 Imp./min gemessen. Das in dem Reagenzglas enthaltene Insulin wurde nun nach B. II.2.4.2. an 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol gekoppelt; nach erfolgter Ätherextraktion wurde es mit 0,1ml Boratpuffer, pH 10,0 versetzt. Der Ansatz wurde heftig geschüttelt und 5 Minuten lang bei 23°C und 3000 U/min zentrifugiert. Die flüssige Phase wurde vollständig in ein PPN-Röhrchen pipettiert, dessen Aktivität in einem γ -Szintillationszähler mit 731 Imp./min gemessen wurde. Der verbliebene Restniederschlag an 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde mit weiteren 0,1ml Boratpuffer versetzt und ebenfalls 5 Minuten lang bei 3000 U/min klarzentrifugiert. Die flüssige Phase wurde wiederum in ein PPN-Röhrchen pipettiert; die gemessene Radioaktivität lag bei 255 Imp./min.

Die Aktivität des verbliebenen Restniederschlages konnte aus technischen Gründen nicht exakt bestimmt werden, da das bei der Synthese des 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols benötigte Kristallglas nicht zur Aktivitätsbestimmung in dem γ -Szintillationszähler geeignet war. Darüber hinaus war es nicht möglich, diesen Restniederschlag ohne erhebliche Substanzverluste in entsprechende Küvetten zu überführen.

8. III.3.4. Bestimmung der bei der Ätherextraktion aufgetretenen Verluste an 125-Jod-Insulin

Der zur Ätherextraktion verwendete Diäthyläther wurde in einzelnen PPN-Röhrchen aufbewahrt und in einem γ -Szintillationszähler auf seinen Radioaktivitätsgehalt hin untersucht. Dies diente der semiquantitativen Erfassung der durch Diffusion und Pipettierungenauigkeit entstandenen Verluste an 125-Jod-Insulin bei der in 8. II.2.4.2. erfolgten Ätherextraktion. Die dabei ermittelte Gesamtaktivität der ersten Ätherextraktion betrug 436 Imp./min, die bei der zweiten 51 Imp./min sowie die bei der dritten 33 Imp./min. Der Background lag bei 38 ± 25 Imp./min.

8. III.3.5. Interpretation der Meßergebnisse (siehe auch Tab. 8. III.3.1.)

Aus den Untersuchungen in 8. III.3.3. geht hervor, daß nur ein sehr geringer prozentualer Anteil des 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols (etwa 1,3%) in 0,1ml 0,1 M Boratpuffer, pH 10 löslich ist.

Aus 8. III.3.4. ergibt sich ferner, daß nur etwa 0,7% des 125-Jod-Insulins bei der ersten Ätherextraktion sowie 0% bei der zweiten und dritten Extraktion in die Ätherphase gelangen. Der überwiegende Anteil des 125-Jod-Insulins und demzufolge auch des 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols liegt daher in dem unlöslichen Niederschlag vermutlich in Form schwer löslicher intermolekularer Quervernetzungen vor.

8. III.4. Säulenchromatographische und photometrische Untersuchung des 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols nach Kopplung an Glycin oder Albumin

8. III.4.1. Herstellung einer mit Sephadex G-50 gefüllten Chromatographiesäule

8. III.4.1.1. Materialien

1000ml Becherglas

Analysenwaage (Meßbereich: 0,01g bis 1000g)

Typ 2254, Sartorius-Werke GmbH, Göttingen

Laboratoriumsspatel

Thermometer (Meßbereich: -20°C bis $+40^{\circ}\text{C}$)

Glasstab

Glastrichter

1000ml Meßkolben

Chromatographiesäule 50cm x 1,6cm, Serva-Technik

250ml Erlenmeyerkolben

Parafilm

Rotationsverdampfer

Wasserstrahlpumpe

Plastiktrichter

7000 Ultrarac Fraction Collector LKB Bromma

8300 Uvicord LKB Bromma

Peristaltik-Elektropumpe Technicon (Ireland):

115V; 0,4 Amp.; 50Hz.

PS-Röhrchen, Art.Nr. 160101 Greiner, Labortechnik, Nürtingen

Photometer PM Q II, Carl Zeiss

Photometerküvetten $\varnothing$ 1cm

Quarzküvetten $\varnothing$ 1cm

B. III.4.1.2. Reagentien

Harnstoff zur Analyse

Art. 8487 E.Merck, Darmstadt

Sephadex G-50 Fine

Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden

Nr. 01-900-1-1857-02

Glycin

Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg

B. III.4.1.3. Herstellung von 7 M Harnstofflösung

7 M (420,42g) Harnstoff wurden in ein 1000ml Becherglas eingewogen. 500ml demineralisiertes Wasser wurden hinzugefügt, im Wasserbad auf 40°C erwärmt und solange mit einem Glasstab verrührt, bis daß sich die gesamte Harnstoffmenge darin gelöst hatte. Diese Lösung wurde, nachdem sie sich auf Raumtemperatur abgekühlt hatte, über einen Glastrichter in einen 1000ml Meßkolben gegossen und dieser mit weiterem demineralisierten Wasser bis zur 1000ml Markierung aufgefüllt. Der Kolben wurde mit einem Glasstopfen verschlossen, geschüttelt und bei Raumtemperatur (23°C) aufbewahrt.

Vor jeder Verwendung von Harnstofflösung wurde diese am Rotationsverdampfer bei Unterdruck entgast.

B. III.4.1.4. Quellen von Sephadex G-50 in 7 M Harnstofflösung

B. III.4.1.4.1. Mathematische Berechnung der benötigten Sephadexmenge

Nach $V_s = \pi \cdot r^2 \cdot l$ ergab sich mit $r=0,8\text{cm}$ und $l=60\text{cm}$ ein effektives Fassungsvermögen der Chromatographiesäule von 120cm^3 . Das

Bettvolumen pro Gramm Trockengel an Sephadex G-50 lag nach Angaben des Herstellers bei 10cm^3 . Zum Füllen der Chromatographiesäule wurden daher 12g Sephadex G-50 benötigt.

B. III.4.1.4.2. Durchführung

12g Sephadex G-50 wurden in einem 250ml Erlenmeyerkolben eingewogen. 200ml 7 M Harnstofflösung wurden hinzugegossen und der entsprechende Erlenmeyerkolben mit Parafilm zugedeckt und über Nacht, d.h. ca. 12 Stunden lang zum Quellen stehengelassen.

B. III.4.1.5. Beschickung der Chromatographiesäule mit Sephadex G-50

B. III.4.1.5.1. Vorbereitungen

Das in 7 M Harnstofflösung über Nacht gequollene Sephadex G-50 wurde in den 1000ml Kolben des Rotationsverdampfers überführt und bei Unterdruck und Raumtemperatur (23°C) 20 Minuten lang entgast. Damit sollte verhindert werden, daß Luftblasen das feine Kapillarsystem bei der Chromatographie verstopfen.

B. III.4.1.5.2. Durchführung

Ein Plastiktrichter wurde auf die Glassäule, die über ein feines Kapillarsystem mit einem Photometer und einem Fraktionssammler verbunden war, aufgesetzt. In diesen Trichter wurde die Sephadexsuspension gegossen; nach wenigen Minuten wurde begonnen, aus dem unteren Säulenauslaß die Harnstofflösung abzupumpen (Förderrate: $0,32\text{ml/min}$).

Dabei sedimentierte die Suspension und bildete ein festes Gel, dessen obere Grenze sich in der Säule befand. Als der Überste-

hende Flüssigkeitsspiegel bis auf das obere Säulenende abgesunken war, wurde der obere Säulenverschluß aufgeschraubt und mit dem Flüssigkeitsreservoir verbunden.

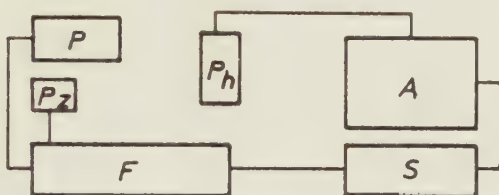


Abb. 8. III.1.: Schaltplan des chromatographischen Systems
(F =Fraktionssammler, P_z =Photozähler, P =Peristaltikpumpe, P_h =Photometer, S =Stabilisator des Indikatorgerätes, A =Indikatorgerät)

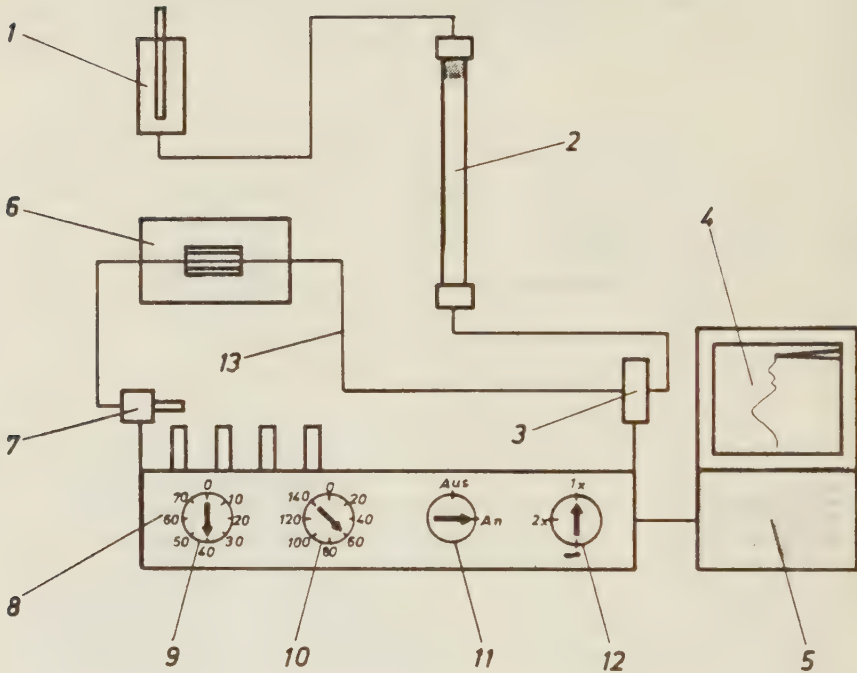


Abb. 8. III.2.:

Chromatographisches System

(1=Flüssigkeitsreservoir mit Belüftungsstab, enthält 7 M Harnstofflösung; 2=Chromatographiesäule; 3=Photometer; 4=Indikatorgerät; 5=Stabilisator; 6=Peristaltikpumpe; 7=Photozähler; 8=Fraktionssammler; 9=Schalter für die Fraktionszahl; 10=Schalter für die Anzahl der Tropfen pro Fraktion; 11=An- und Aus-schalter; 12=Schalter für die Chromatographiehäufigkeit, 13=Kapillarsystem der Chromatographiesäule.)

9. III.4.2. Chromatographische und photometrische Untersuchung des 1-Insuliny-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzols

8. III.4.2.1. Allgemeine Vorbemerkung

Die Effizienz der Derivatisierung des Insulins sollte chromatographisch untersucht werden. Es war daher erforderlich, das reaktive Fluoratom durch eine nicht-reaktive Gruppe zu substituieren; dies wurde durch Reaktion mit der zehnfachen Menge an Glycin erreicht. Dabei entstand 1-Insuliny-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzol. Die Herstellung dieser Verbindung erfolgte nach 8. III.4.2.2. in 0,1 M Boratpuffer sowie nach 8. III.4.3.1. in 7 M Harnstofflösung (ungepuffert). Gleichzeitig konnte damit eine Beeinflussung der photometrischen Untersuchungen durch den pH-Wert erfaßt werden.

8. III.4.2.2. Bindung von Glycin an 1-Insuliny-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol in 0,1 M Boratpuffer, pH 10

Nach 8. II.2.4.2. gereinigtes 1-Insuliny-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde mit 0,1ml 0,1 M Boratpuffer, pH 10 versetzt. Der darin lösliche Anteil des aktivierten Insulins wurde unverzöglich in ein Reagenzglas pipettiert, das mit der zehnfachen molaren Menge an Glycin gefüllt war. Das Glycin löste sich spontan und vollständig in der Boratlösung. Bei einem Molekulargewicht des Schweineinsulins von 5733 und einem Molekulargewicht des Glycins von 75 wurden 13,1% der Masse des Insulins, auf 1mg Schweineinsulin bezogen folglich 0,13mg Glycin benötigt.

Anmerkung: Beim 1-Insuliny-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzol und beim 1-Glyciny-5-Insuliny-2,4-Dinitrobenzol handelt es sich um die gleiche Substanz; der ersten Bezeichnung wurde hier der Vorzug gegeben.

Reaktionsgleichung:

1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol + Glycin

$\xrightarrow{-\text{HF}}$ 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzol

Der bei der Reaktion in äquimolarem Verhältnis entstandene Fluorwasserstoff wurde durch den Boratpuffer, pH 10 neutralisiert.

B. III.4.2.3. Gelchromatographische Reinigung des synthetisierten 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzols

Die oberhalb der Sephadexsäule befindliche Menge an 7 M Harnstofflösung, die ein Austrocknen der Säule verhindern sollte, wurde vollständig mittels Eppendorfpipette abgesaugt. Die zu trennende Lösung aus B. III.4.2.2. wurde mit einer 0,1ml Eppendorfpipette auf die Chromatographiesäule gegeben. Der Fraktions-sammler wurde auf 60 Tropfen/Fraktion sowie auf eine Gesamtzahl von 40 Fraktionen eingestellt. Daraufhin wurde das Gerät eingeschaltet. Die Peristaltikpumpe förderte nun die aufgetragene Lösung durch die Chromatographiesäule, bis daß sich keine Lösung davon mehr oberhalb der Sephadexkolonne befand. Der Fraktions-sammler wurde abgeschaltet, die Glassäule bis an ihren oberen Rand mit 7 M Harnstofflösung aufgefüllt und an ein Reservoir mit weiterer Harnstofflösung angeschlossen. Durch das Trockenlaufenlassen der oberen Sephadexschicht sollte die Diffusionsmöglichkeit für das synthetisierte 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzol in die Harnstofflösung herabgesetzt werden, um dadurch die chromatographische Trennschärfe zu verbessern. Das Gerät wurde erneut in Betrieb gesetzt und die bei der Chromatographie gewonnenen 40 Fraktionen nacheinander in insgesamt 40 Polystyrolröhrchen aufgefangen und zur weiteren photometrischen Bestimmung aufbewahrt. Das Flüssigkeitsvolumen der einzelnen Polystyrolröhrchen lag bei 3,4ml/Röhrchen.

B. III.4.2.4. Photometrische Bestimmung des in Soratpuffer, pH 10 gelösten und gelchromatographisch gereinigten 1-Insulinyl-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzols

Die jeweilige Extinktion der nach B. III.4.2.3. gewonnenen 40 Fraktionen wurde in einem Zeissphotometer bei $\lambda=340\text{nm}$ bestimmt. Das Ergebnis der jeweiligen Messung ist aus Tab. B. III.4.1. ersichtlich und in Abb. B. III.3. graphisch dargestellt.

B. III.4.2.5. Spektrum der Fraktionen 27 und 28 der in B. III. 4.2.4. erfolgten Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$

Da sich in Fraktion 27 und 28 die höchsten Extinktionswerte bei $\lambda=340\text{nm}$ fanden, wurde von ihnen ein Spektrum aufgenommen, um die darin absorbierende Substanz näher zu charakterisieren. Dazu wurden die Extinktionen der Fraktionen 27 und 28 beginnend bei $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ in Quarzküvetten gegen 7 M Harnstofflösung gemessen. Von $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=320\text{nm}$ wurde im UV-Bereich gemessen, bei $\lambda=325\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ wurde im sichtbaren Wellenlängenbereich gearbeitet; hierfür wurde ab $\lambda=325\text{nm}$ sowie ab $\lambda=385\text{nm}$ ein Streulichtfilter zwischengeschaltet. Das Ergebnis dieser spektral-photometrischer Untersuchung ist aus Tab. B. III.4.2. ersichtlich und in Abb. B. III.4. graphisch dargestellt.



Abb. 8.III.3.: Photometrische Bestimmung des in 0,1 M Boratpuffer, pH 10 gelösten und gelchromatographisch über Sephadex G-50 gereinigten 1-Insuliny-1-5-Glycyl-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 340\text{nm}$

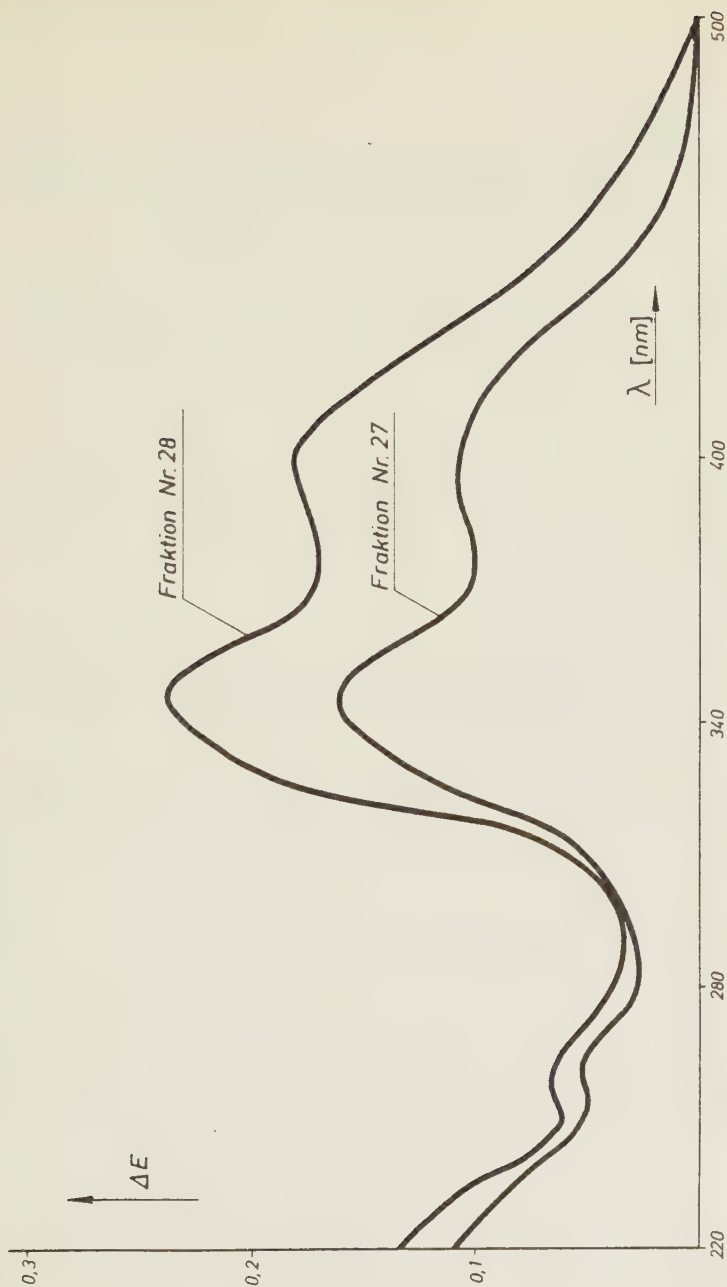


Abb. 8.III.4.: Absorptionsspektren der gelchromatographisch gereinigten Fraktionen Nummer 27 und 28 des in 0,1 M Boratpuffer gelösten 1-Insuliny-1-5-glycyl-2,4-dinitrobenzols

9. III.4.3. Spektralphotometrische Untersuchung des in 0,1ml 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) gelösten und gelchromatographisch gereinigten 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzols

9. III.4.3.1. Substitution der Fluorgruppe im 1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol durch die Aminosäure Glycin in 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert)

Der in 0,1ml 7 M Harnstofflösung lösliche Anteil an 1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde in ein Reagenzglas pipettiert, das mit 0,13mg Glycin gefüllt war (vergleiche dazu B. III.4.2.2.). Die Aminosäure Glycin löste sich spontan in dieser Harnstofflösung.

9. III.4.3.2. Gelchromatographie des 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzols

Die Säulenchromatographie erfolgte nach der in B. III.4.2.2. beschriebenen Methode. Die einzelnen Fraktionen wurden ebenfalls in 40 Polystyrolröhrchen aufgefangen und für die photometrischen Untersuchungen aufbewahrt.

9. III.4.3.3. Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$

Die jeweiligen Extinktionswerte der nach B. III.4.3.2. gewonnenen 40 Fraktionen wurden mittels Zeissphotometer bei $\lambda=340\text{nm}$ bestimmt (vergleiche dazu auch B. III.4.2.4.). Die dabei ermittelten Meßergebnisse sind aus Tab. B. III.4.3. ersichtlich und in Abb. B. III.5. graphisch verdeutlicht.



Abb. 8.III.5.: Photometrische Bestimmung des in 0,1 ml (1) 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) gelöst und gelchromatographisch über Sephadex G-50 gereinigten 1-Insulins-5-Glycyl-L-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 340\text{nm}$

B. III.4.3.4. Spektrum der Fraktionen 13 und 25 der in B. III.4.3.3. durchgeführten Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$

Die Extinktionen der Fraktionen 13 und 25 wurden beginnend mit $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ in Quarzküvetten gegen 7 M Harnstofflösung gemessen (Weitere Einzelheiten sind aus B. III.4.2.5. zu entnehmen.). Das Ergebnis der spektralphotometrischen Untersuchung ist aus Tab. B. III.4.4. ersichtlich und in Abb. B. III.6. graphisch dargestellt.

B. III.4.4. Spektralphotometrische Untersuchung des in 0,2ml(!) 7 M Harnstofflösung gelösten und gelchromatographisch gereinigten 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzols

B. III.4.4.1. Substitution der Fluorgruppe im 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol durch die Aminosäure Glycin in 0,2ml 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (un-gepuffert)

Der nach B. III.1.1.1.6. in insgesamt 0,2ml 7 M Harnstofflösung lösliche Anteil an 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde mit 0,13mg Glycin versetzt (vergleiche dazu B. III.4.2.2.). Der Ansatz wurde etwa 1 Stunde lang zum Reagieren stehengelassen, um die Bildung von 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzol zu ermöglichen.

B. III.4.4.2. Gelchromatographische Reinigung des synthetisierten 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzols über Sephadex G-50

Die Säulenchromatographie erfolgte analog der in B. III.4.2.3. beschriebenen Methode; die dabei gewonnenen 40 Fraktionen wurden zur weiteren photometrischen Bestimmung in B. III.4.4.3. herangezogen.

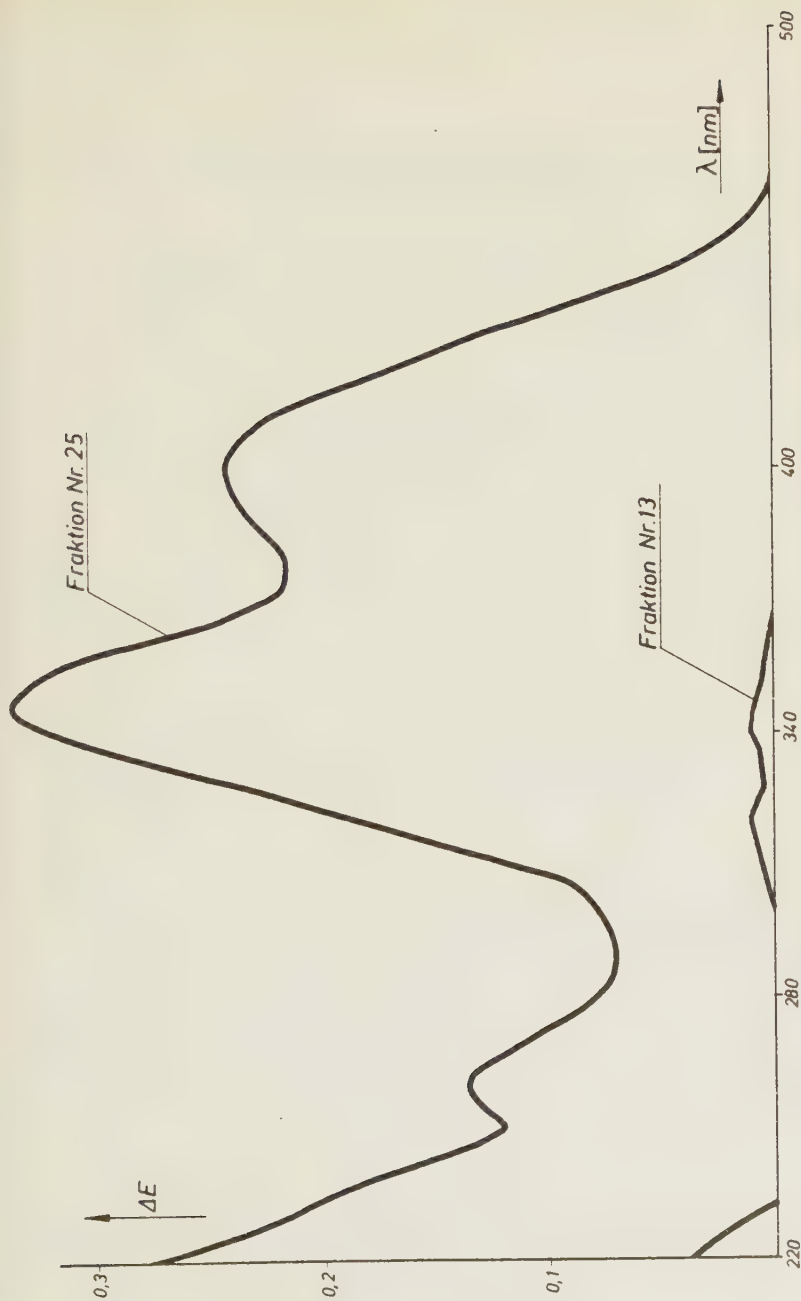


Abb. 8.III.6.: Absorptionsspektren der durch Gelchromatographie gewonnenen Fraktionen Nummer 13 und 25 des in 0,1 ml (l) 7M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) gelösten 1-Insuliny-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzols

3. III.4.4.3. Photometrische Bestimmung des 1-Insulinyl-5-Glycinyl-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda=340\text{nm}$

Die jeweilige Messung der Extinktionen erfolgte nach der in 8. III.4.2.4. beschriebenen Methode. Die dabei gewonnenen Meßergebnisse sind aus Tab. III.4.5. ersichtlich und in Abb. B. III.7. graphisch dargestellt.

9. III.4.4.4. Spektrum der Fraktionen 14 und 26 der in 8. III.4.4.3. durchgeführten Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$

Die Extinktionen der Fraktionen 14 und 26 wurden in einem Wellenlängenbereich von $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ in Quarzküvetten gegen 7 M Harnstofflösung gemessen. Die Meßergebnisse sind aus Tab. 8. III.4.6. zu entnehmen; eine graphische Darstellung erfolgte in Abb. B. III.8.

8. III.4.5. Säulenchromatographische und photometrische Untersuchung des mit Rinderalbumin versetzten 1-Insulinyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols

B. III.4.5.1. Gelchromatographie

Chromatographiert wurde der in 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 lösliche Anteil des nach 8. II.2.5.3. synthetisierten Insulinderivates (siehe auch 8. III.1.1.2.). Die dabei gewonnenen 40 Fraktionen wurden bei $\lambda=340\text{nm}$ sowie bei $\lambda=275\text{nm}$ photometriert. Die zur Gelchromatographie benutzte Säule war zuvor mit Sephadex G-50 beschickt worden.

8. III.4.5.2. Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$

Die jeweiligen Extinktionen der nach 8. III.4.5.1. gewonnenen

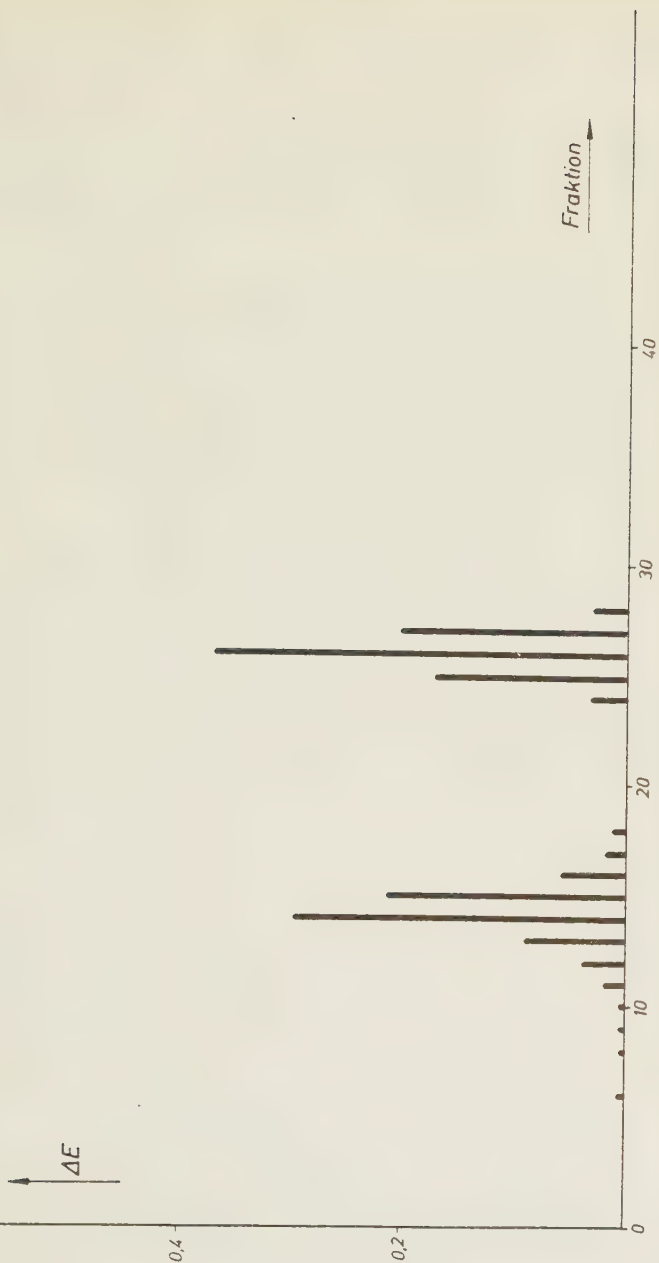


Abb. 8.111.7.: Photometrische Bestimmung des in 0,2 ml (1) 7M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) gelösten und gelchromatographisch über Sephadex G-50 gereinigten 1-Insulinyl-5-glycyl-L-2,4-dinitrobenzois bei $\lambda = 340\text{nm}$



Abb. B.III.8.: Absorptionsspektren der durch Gelchromatographie gewonnenen Fraktionen Nummer 14 und 26 des in 0,2 ml (1) 7M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) gelösten 1-Insuliny-5-Glycyl-2,4-Dinitrobenzols

40 Fraktionen wurden mit einem Zeissphotometer bei $\lambda=340\text{nm}$ bestimmt. Die dabei erhaltenen Meßwerte sind aus Tab. III.4.7. ersichtlich; die graphische Darstellung erfolgte in Abb. B.III.9.

B. III.4.5.3. Photometrie bei $\lambda=276\text{nm}$

Die jeweiligen Extinktionen der nach B. III.4.5.1. gelchromatographisch gewonnenen 40 Fraktionen wurden mit einem Zeissphotometer bei $\lambda=276\text{nm}$ bestimmt. Dabei ergaben sich die aus Tab. B. III.4.8. ersichtlichen und in Abb. B. III.10. graphisch dargestellten Meßergebnisse.

B. III.4.6. Eichung der Chromatographiesäule

B. III.4.6.1. Allgemeines

Eine Eichung der Chromatographiesäule mittels Rinderalbumin wurde durchgeführt, um ein Bezugssystem für die chromatographischen Untersuchungen, an denen zum Teil auch Rinderalbumin beteiligt war, zu erhalten.

B. III.4.6.2. Materialien

Serumalbumin vom Rind reinst für
wissenschaftliche Untersuchungen
Behringwerke AG, Marburg (DRHD 196 02991)

di-Natriumtetraboratpuffer (vergleiche B. II.2.5.1.)

7 M Harnstofflösung (vergleiche B. III.4.1.3.)



Abb. B.III.9.: Photometrische Bestimmung des in 0,1 ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 löslichen Anteils des an Rinderalbumin gekoppelten 1-Insulins 1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 340\text{nm}$

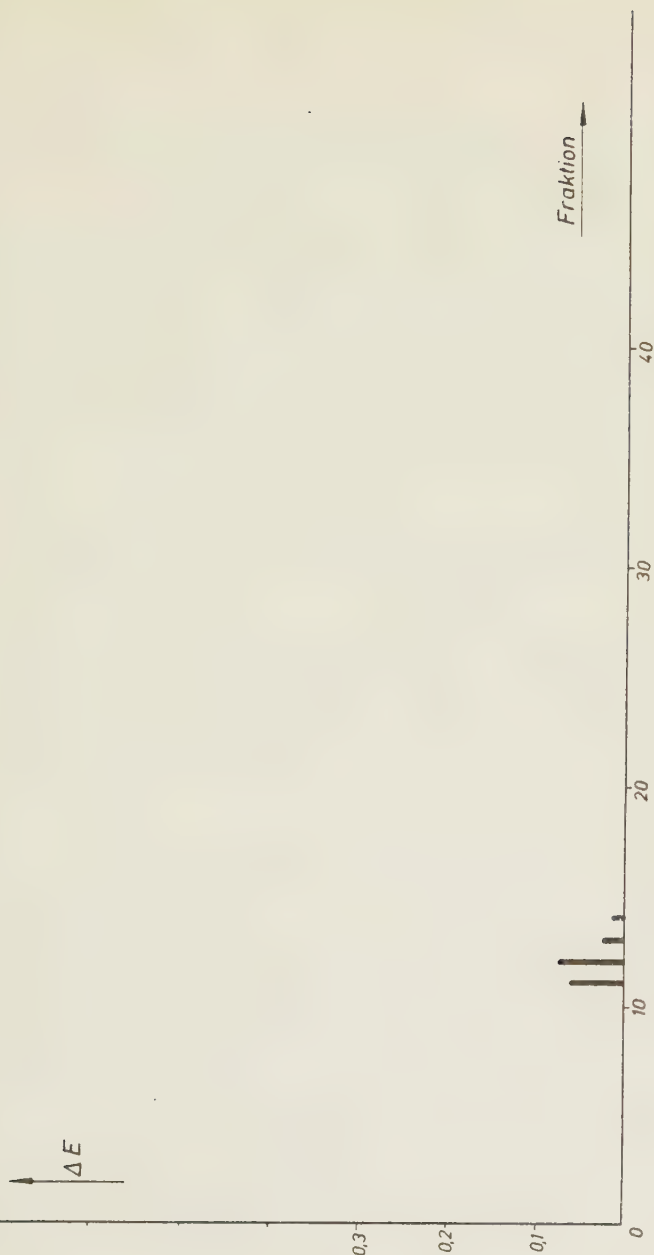


Abb. 8.III.10.: Photometrische Bestimmung des in 0,1 ml Guanidin-phosphatpuffer, pH 7,2 löslichen Anteils des an Rinderalbumin gekoppelten 1-Insuliny 1-S-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 276\text{nm}$

B. III.4.6.3. Gelchromatographie und Photometrie bei $\lambda=276\text{nm}$

1mg Rinderalbumin wurde in 0,1ml Boratpuffer, pH 10 gelöst und mit 0,4ml 7M Harnstofflösung versetzt. Die gesamte Lösung wurde nun über der mit Sephadex G-50 beschickten Säule chromatographisch gereinigt. Die dabei gewonnenen 40 Fraktionen wurden anschließend mit einem Zeissphotometer bei $\lambda=276\text{nm}$ photometriert (Bei $\lambda=276\text{nm}$ befindet sich das Absorptionsmaximum der Aminosäure Tyrosin im Rinderalbumin.). Die Meßergebnisse sind aus Tab. III. 4.9. ersichtlich, die zugehörige graphische Darstellung erfolgte in Abb. 8. III.11.

B. III.4.6.4. Spektralphotometrische Untersuchung der Fraktion 11

Die Extinktionen der Fraktion 11 aus 9. III.4.6.3. wurden beginnend mit $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ in Quarzküvetten gegen 7 M Harnstofflösung in einem Zeissphotometer gemessen (vergleiche B. III.4.2.5.). Das Ergebnis dieser Untersuchung ist aus Tab. 8. III.4.10. ersichtlich und in Abb. 8. III.12. graphisch dargestellt.

B. III.4.7. Zusammenfassung und Beurteilung

Das mit Rinderalbumin versetzte 1-Insuliny-1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol löste sich weder in dem stark alkalischen 0,1 M di-Natriumtetraboratpuffer, pH 10,0 noch in dem (fast) neutralen Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 noch in dem alkalischen, jedoch ungepufferten 7 M Harnstoff vollständig auf. Auch nach Senkung der Osmolalität der Lösung durch Reduktion der niedermolekularen Bestandteile (insbesondere der verwendeten Salze) mittels Membrandialyse ließ sich der aufgetretene gelbe, proteinhaltige Niederschlag nur unvollständig lösen.

Der Proteincharakter des gelben Niederschlages wurde insbeson-

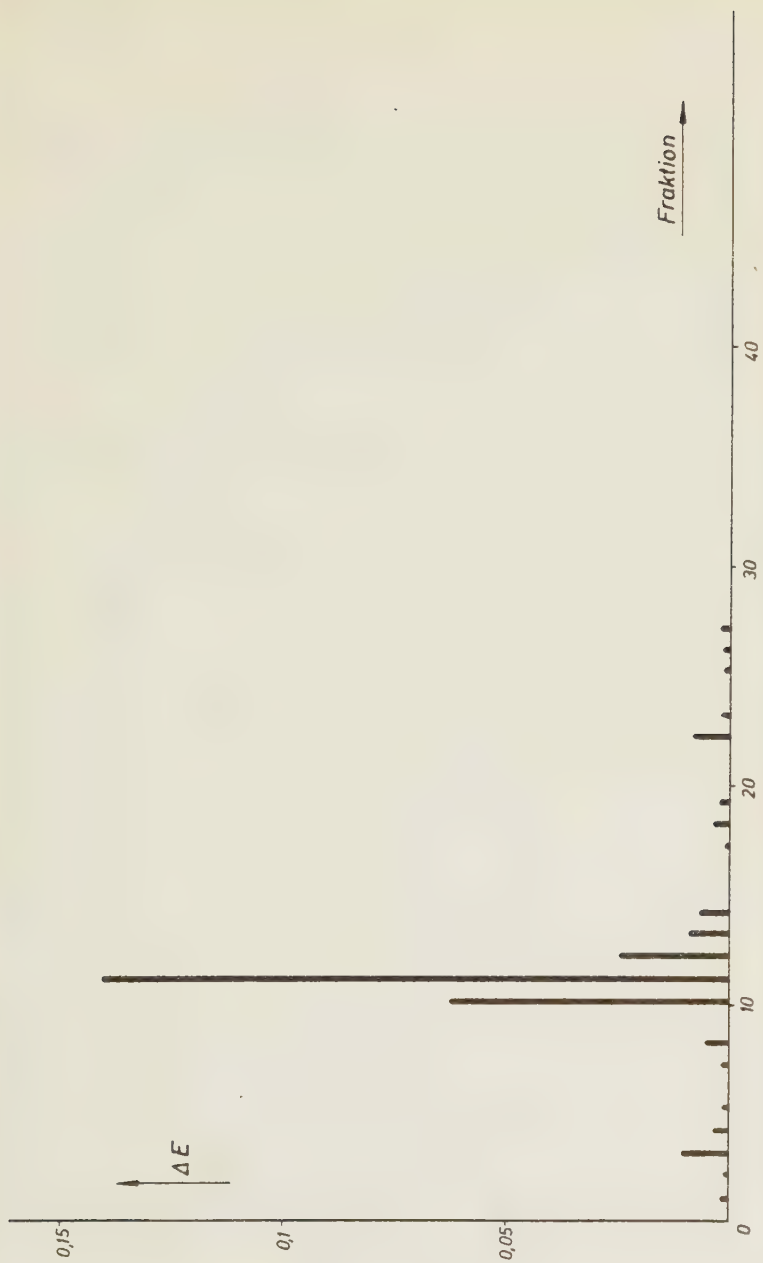


Abb. B.III.11.: Photometrische Bestimmung des über Sephadex G-50 gelchromatographisch gereinigten Rinderalbumins (1mg) bei $\lambda = 278\text{nm}$



Abb. B.III.12.: Spektrum des Rinderalbumins

dere durch seine Strukturlosigkeit (vergleiche 8. III.2.1. - 8. III.2.4.) bei der mikroskopischen Untersuchung deutlich.

Die Ergebnisse bei der radiochemischen Untersuchung verdeutlichen, daß sich nur etwa 1,3% der eingesetzten Menge an Schweineinsulin in der Lösung, der verbleibende Rest hingegen, soweit er nicht zu etwa 0,7% in die Ätherphase bei der ersten Extraktion gelangt war, innerhalb des gelben Niederschlages befindet.

Die gelchromatographischen Untersuchungen über Sephadex G-50 des mit der zehnfachen molaren Menge der Aminosäure Glycin versetzten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols zeigen: Das in 0,1ml 0,1 M Boratpuffer, pH 10 gelöste 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzol wandert bei einer Ausschlußgrenze von MG 40 000 bis MG 60 000 im Retentionsvolumen. Verwendet man 0,1ml(!) 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert) als Lösungsmedium, so ergeben sich lediglich höhere absolute Extinktionswerte, jedoch keinerlei weitere Änderungen des photometrischen oder spektralphotometrischen Verhaltens der Lösung. In beiden Untersuchungen sind die jeweiligen Spektren durch ein relatives Absorptionsmaximum bei $\lambda=340\text{nm}$ sowie durch ein relatives Absorptionsminimum bei $\lambda=276\text{nm}$ gekennzeichnet. Löst man jedoch den in 0,1ml 7 M Harnstofflösung unlöslichen gelben Niederschlag in weiteren 0,1ml 7 M Harnstofflösung, so ergibt sich bei der Photometrie bei $\lambda=340\text{nm}$, daß ein Teil des gelchromatographisch gereinigten 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzols auch im Ausschlußvolumen wandert.

Daraus läßt sich folgern, daß sich bei dem erneuten Lösungsversuch ein Teil des Niederschlages gelöst haben muß. Da das 1-Insulinyll-5-Glycinyll-2,4-Dinitrobenzol mit einem Molekulargewicht von 6010 weit unterhalb der Ausschlußgrenze der Sephadexsäule liegt, mußte es zuvor zu intermolekularen Quervernetzungen zwischen den einzelnen Eiweißmolekülen gekommen sein; eine alleinige Aggregation der Moleküle ist bei der Verwendung von 7 M Harnstofflösung als Elutionsmittel nahezu auszuschließen(Lit.39).

Betrachtet man in diesem Zusammenhang das Absorptionsspektrum der Fraktion 14 im Ausschlußvolumen in Abb. 9. III.8., so ist es ebenfalls durch ein relatives Absorptionsmaximum bei $\lambda=340\text{nm}$ charakterisiert, jedoch ist dabei auch der steile Extinktionsanstieg im UV-Bereich hervorzuheben. Dieser Anstieg ist damit durch den relativ hohen Gesamtgehalt an Peptidbindungen des aus quervernetzten Molekülen bestehenden Ausschlußvolumens zu erklären.

Bei der gelchromatographischen und photometrischen Bestimmung des mit Rinderalbumin versetzten 1-Insuliny-5-Fluor-2,4-Dinitrobenzols ergibt sich aus Abb. 9. III.9. und Abb. 8. III.10.: In Fraktion 12 bis 14 absorbiert der Dinitrophenylrest bei $\lambda=340\text{nm}$ (Die Maximalmenge befindet sich dabei in Fraktion 13.), in Fraktion 11 bis 13 absorbiert das Tyrosin in dem Rinderalbumin bei $\lambda=276\text{nm}$ (Die Maximalmenge befindet sich dabei in Fraktion 12.). Da die Absorptionsmaxima des Dinitrophenylrestes und des Tyrosins sich in unterschiedlichen Fraktionen finden, ist daraus zu schließen, daß ein Teil des Albumins nicht an das 1-Insuliny-5-Fluor-2,4-Dinitrobenzol gekoppelt wurde und daß ferner auch hierbei ein Teil des Insulinderivates möglicherweise in Form von Quervernetzungen vorliegt.

Mit dieser von Tager(Lit.39) entwickelten Methode konnte somit am Beispiel des Schweineinsulins keine optimale Bindung an das Rinderalbumin erreicht werden, da es hierbei unter anderem zu einer Insulinpolymerisation über das 1,5-Difluor-2,4-Dinitrobenzol kam, die die Kopplungseffizienz an das Rinderalbumin entscheidend reduzierte.

B. IV. Immunisierung von Meerschweinchen mit Insulinderivat vom Schwein

B. IV.1. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich männliche Jungtiere mit einem Ausgangsgewicht zwischen 650g und 800g verwendet. Die Meerschweinchen wurden nummeriert und vor jeder subkutanen Injektion des nach B. II.3.4. hergestellten, injektionsfertigen Impfstoffes mit einem Rasiermesser am Rücken sowie am Nacken kahlgeschoren.

B. IV.2. Injektionsmaterial

Zur subkutanen und zur intramuskulären Injektion wurden sterile Kanülen Nr. 1 mit Luer-Konus benutzt; die Lokaldesinfektion erfolgte mit Alkoholtupfern. Injiziert wurde das auf zwei 10ml Spritzen verteilte Insulinderivat (vergleiche B. II.3.4.). Zur einmaligen Injektion von Pertussis-Vakzine wurde eine 5ml Spritze verwendet. Die benutzte Pertussis-Stammsuspension Op.Nr. 1315/1316 vom Behring Institut in Frankfurt/Main enthielt etwa 20×10^9 Keime/ml, der Anteil des als Konservierungsmittel benötigten Merthiolats betrug 0,1mg/ml.

B. IV.3. Injektionstechnik und Injektionsintervall

Zehn Meerschweinchen erhielten eine einmalige intramuskuläre Injektion von jeweils 0,5ml Pertussis-Stammsuspension zur Stimulierung ihres Immunsystems. Anschließend wurden die Tiere 1 bis 9 auf ihrem Rücken und Nacken kahlgeschoren und bei ihnen die Injektion von Insulinderivat in Form von multiplen, subkutanen Quaddeln vorgenommen. Tier 10 verblieb als Kontrolltier und wurde nicht immunisiert. Bei dieser Immunisierung erhielten die Tiere 1 bis 9 jeweils maximal 0,22mg Insulinderivat/Injektion (Diese Menge ergibt sich aus der Summe von 1mg Schweine-

insulin und 1mg Rinderalbumin verteilt auf 3 Meerschweinchen; die wesentlich geringere Menge des Dinitrophenylrestes wurde dabei rein rechnerisch vernachlässigt.).

Die ersten drei Boosterungen erfolgten in einem Intervall von 14 Tagen; der Zeitabstand zwischen der vierten und fünften Boosterung betrug lediglich 7 Tage. Dabei wurden ebenfalls 0,22mg Insulinderivat je Versuchstier injiziert; die Injektion erfolgte jedoch nur in Form einer einzigen subkutanen Quaddel am Nacken oder Rücken der jeweiligen Meerschweinchen.

Die zur Injektion vorgesehenen Hautpartien wurden mit einem Alkoholtupfer gereinigt; ein steriles Vorgehen war jedoch aufgrund des a priori unsterilen Impfstoffes nicht möglich. Bei einem Teil der Meerschweinchen traten **auch prompt** Hautinfektionen, kompliziert durch kleinere Ulzera, auf, die sich jedoch symptomatisch mittels Bepanthen^R Salbe (Panthenol) beherrschen ließen.

8. IV.4. Blutabnahme zur Bestimmung des Titers an Insulinantikörpern

8. IV.4.1. Materialien

Eppendorfküvetten

Schere; Tupfer; Finalgon^R Creme

Zentrifuge: Mikro Rapid von Hettich

8. IV.4.2. Durchführung

Alle zehn Meerschweinchen wurden an einem ihrer Ohrläppchen mit Finalgon^R Creme bestrichen, um eine lokale Durchblutungssteigerung zu erzielen. Nach zehnminütiger Einwirkungszeit wurde je eine Ohrvene nach digitaler Kompression mit einem schnellen Scherenschnitt inzidiert. Der erste Blutstropfen wurde an einem

Tupfer verworfen, das nachströmende Blut jedoch in der entsprechend nummerierten Eppendorfküvette aufgefangen. Die dabei gewonnene Blutmenge (vier bis acht Blutstropfen) genügte zur Bestimmung des Titors an Insulinantikörpern.

9.IV.4.3. Serumgewinnung

Die von 1 bis 10 nummerierten, mit Meerschweinchenblut gefüllten Eppendorfküvetten wurden, nachdem das Blut geronnen war, 10min lang bei 2400 U/min zentrifugiert. Das oberhalb des Blutkuchens nun befindliche Meerschweinchenserum wurde mittels Eppendorfpipette aufgesaugt und in B. V.1.3. auf seinen Antikörpertiter hin untersucht.

9. IV.5. Entblutung der Meerschweinchen zur Serumgewinnung

9. IV.5.1. Materialien

100ml Zentrifugenglas, **Schott Mainz**
PPN-Röhrchen Art.Nr. 115201, Greiner, Labortechnik, Nürtingen
Eisenstange, Einmalskalpell; Balkenwaage; Zentrifuge

9. IV.5.2. Durchführung

Mit der linken Hand wurden die Meerschweinchen am Rücken gefaßt und mit der rechten Hand durch Nackenschlag (Eisenstange!) betäubt. Danach wurden die großen Halsgefäße der Meerschweinchen mit einem Skalpell eröffnet und das herausströmende Blut in nummerierte 100ml Zentrifugengläser aufgefangen. Die dabei gewonnene Blutmenge schwankte je nach Meerschweinchen zwischen 25ml und 35ml.

B. IV.5.3. Serumgewinnung

Das in 100ml Zentrifugengläser aufgefangene Meerschweinchenblut wurde zum Gerinnen bei Raumtemperatur (20°C) stehengelassen. Auf einer Balkenwaage wurde jedes der 100ml Zentrifugengläser mit Meerschweinchenblut gegen ein mit Leitungswasser gefülltes Zentrifugenglas genau austariert und gegeneinander bei 2400 U/min 10min lang zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde zunächst in ein frisches Zentrifugenglas gegossen, der verbliebene Blutkuchen hingegen verworfen. Das Serum wurde auf mehrere PPN-Röhrchen verteilt, diese jeweils auf der Balkenwaage austariert und bei 2400 U/min 5min lang zentrifugiert. Die vorher im Serum noch verbliebenen korpuskulären Bestandteile wurden dadurch entfernt. Das Meerschweinchen Serum wurde nun in entsprechend nummerierte PPN-Röhrchen pipettiert, verschlossen und bei -80°C tiefgefroren. Mittels dieser Methode wurden die Seren aller Meerschweinchen mit Ausnahme von Tier 6 (vergleiche B. IV.6.) gewonnen.

B. IV.6. Ergänzung

Diese Tierversuchsserie dauerte 8 Wochen. Nach 6 Wochen, i.e. nach der dritten Immunisierung verstarb Tier 6 unter starker Abmagerung trotz zuvor nur geringfügig reduzierter Nahrungsaufnahme. Eine Serumgewinnung war daher nicht mehr in vivo möglich. Eine Klärung der Todesursache durch einen Veterinärpathologen erfolgte nicht. Eine kanzerogene Wirkung durch freies Benzolderivat erscheint denkbar. Die übrigen Tiere befanden sich bis zu ihrer Entblutung in einem guten Allgemeinzustand.

3. V. Bestimmung des Titers an Insulinantikörpern im Radioimmunoassay

3. V.1. Kurzbeschreibung der Bestimmungsmethode

3. V.1.1. Materialien

Eppendorfpipetten

PPN-Röhrchen, Art.Nr. 115201

Greiner, Labortechnik, Nürtingen

Zentrifuge

Absauggerät

γ -Szintillationszähler: Nuclear Enterprise NE 1600

3. V.1.2. Reagentien

125-Jod-Insulinlösung (spezifische Aktivität: 20 000 Imp./min)

Puffer (0,05 Mol/l Phosphat, pH 7,4, 1% BSA)

Rindergammaglobulin

3. V.1.3. Durchführung

Die Seren der Meerschweinchen 1 bis 10 wurden mit Puffer 1:100 verdünnt. Aus jeder dieser zehn Verdünnungen wurden jeweils 0,1ml in ein nummeriertes PPN-Röhrchen pipettiert. 0,1ml 125-Jod-Insulinlösung sowie 0,2ml Puffer wurden hinzupipettiert und der jeweilige Ansatz 72 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 0,1ml Rindergammaglobulinlösung hinzugefügt und heftig auf einem Vortex-Mixer vermischt. Der gesamte Ansatz wurde bei Raumtemperatur und 2400 U/min 30min lang zentrifugiert; der verbliebene Überstand wurde quantitativ abgesaugt. Die in dem PPN-Röhrchen verbliebene Radioaktivität des 125J wurde in einem γ -Szintillationszähler gemessen.

8. V.2. Meßergebnisse

8. V.2.1.1. Bestimmung des Antikörpertiters nach 4 Wochen

Die nach 8. IV.4.3. beschriebene Methode zur Serumgewinnung bei Meerschweinchen erbrachte - 4 Wochen nach der ersten Immunisierung mit Insulinderivat - bei der radiochemischen Untersuchung das aus Tab. 8. V. 1 ersichtliche Ergebnis.

8. V.2.1.2. Beurteilung

Da alle gemessenen Aktivitäten der Serien 1 bis 10 innerhalb des Leerwertbereiches von 859[±]50 CPM lagen, kann man daraus folgern, daß es bei keinem der nach 8. IV.3. mit dem in 8. II.3.3.1. hergestellten Insulinderivat immunisierten Meerschweinchen nach 4 Wochen zur Bildung von Insulinantikörpern gekommen war.

8. V.2.2.1. Bestimmung des Antikörpertiters nach 6 Wochen

Die nach 6 Wochen, d.h. nach zweimaliger Injektion von nach 8. II.3.3.1. hergestelltem Insulinimpfstoff sowie nach einmaliger Injektion von nach 8. II.3.3.2.5. hergestelltem Impfstoff, erfolgte radiochemische Bestimmung der Insulinantikörper erbrachte das aus Tab. 8.V.2. ersichtliche Ergebnis.

8. V.2.2.2. Beurteilung

Vierzehn Tage nach der einmaligen Injektion der Gesamtmenge des nach 8. II.2.5.3. synthetisierten Insulinderivates kam es bei Tier 2 und 3 zu einer geringfügigen Bildung von Insulinantikörpern.

8. V.2.3.1. Bestimmung des Antikörpertiters nach Entblutung der Meerschweinchen 8 Wochen nach Versuchsbeginn

Die nach 8 Wochen, d.h. nach zweimaliger Injektion von nach 8. II.3.3.1. hergestelltem Insulinimpfstoff sowie nach dreimaliger Injektion von nach 8. II.3.3.2.5. hergestelltem Impfstoff, erfolgte radiochemische Bestimmung der Insulinantikörper erbrachte das aus Tab. 8. V.3. ersichtliche Ergebnis. Eine graphische Darstellung erfolgte in Abb. 8. V.1.

8. V.2.3.2. Beurteilung

Nach dreimaliger Injektion der nach 8. II.2.5.3. synthetisierten Gesamtmenge an Insulinderivat finden sich im Serum der Meerschweinchen 2, 3, 4, 5, 7, 8 nachweisbare Insulinantikörper. Der dabei erzielte Antikörpertiter bei einer Verdünnung des Ansatzes von 1:100 ist jedoch sogar im Serum des Tieres Nr. 3, bei dem 40,2% des Traces an Antikörper gebunden werden konnten, zur Verwendung für einen Radioimmunoassay zu gering; hierfür hätte der Bindungsanteil des Antikörpers an das Antigen möglichst über 50% liegen müssen. Es ist jedoch hervorzuheben, daß mit dieser Methode, bei der jedes der Meerschweinchen außer Tier Nr. 10 während der drei Injektionen von nach 8. II.3.3.2.5. hergestelltem Impfstoff nur insgesamt maximal 0,33mg(!) Schweineinsulin erhalten hatte, überhaupt radiochemisch nachweisbare Insulinantikörper gebildet worden sind.

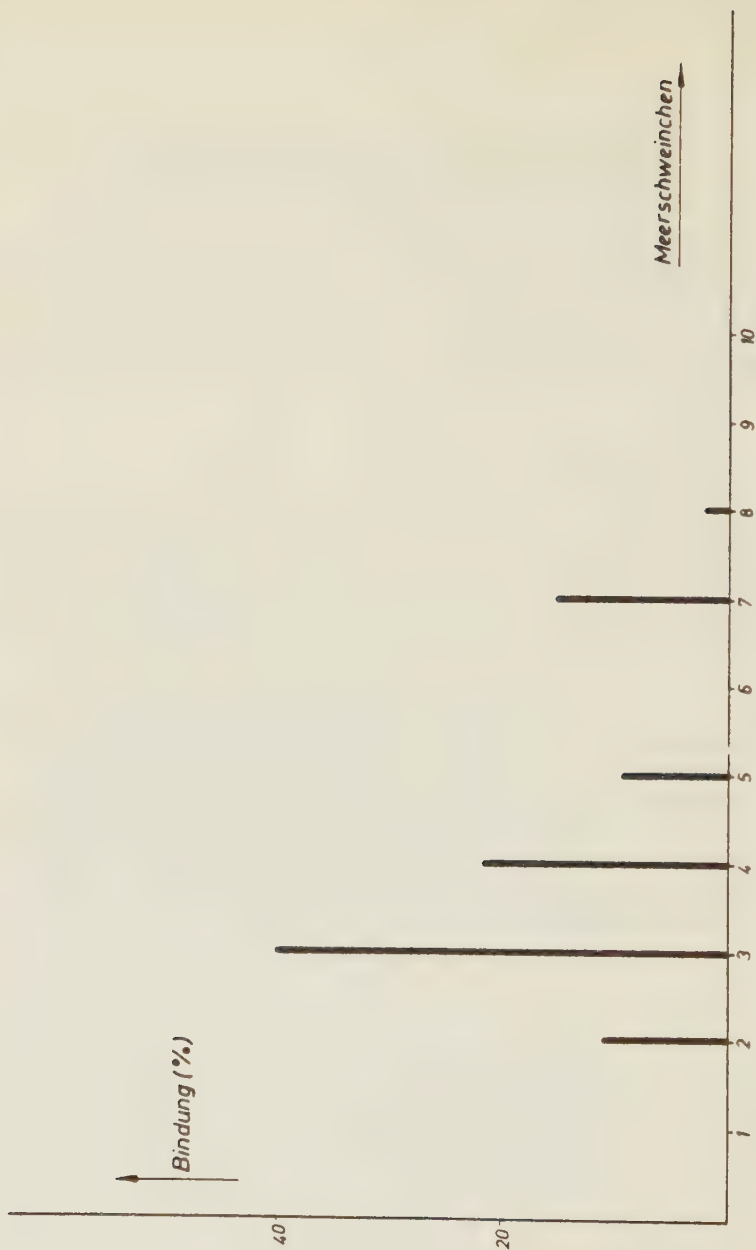


Abb. 8.V.1.: Prozentualer Bindungsanteil der Insulinantikörper an den Tracer nach dreimaliger Injektion von porcinem Insulin mit einer Gesamtmenge von 0,33 mg Insulin/Meerschweinchen
Serumverdünnung 1 : 100

B. VI. Laborchemische Synthese von 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-
-2,4-Dinitrobenzol unter Verwendung von porcinem
C-Peptid

B. VI.1. Allgemeine Vorbemerkung

Physikalisch-chemische Untersuchungen mit humanem C-Peptid konnten nicht durchgeführt werden, da nur insgesamt 4mg(!) humanes C-Peptid zur Verfügung standen; diese Menge wurde jedoch vollständig zur Gewinnung von Antikörpern im Tierversuch benötigt. Aufgrund weitgehender Übereinstimmung hinsichtlich Struktur und Aminosäuregehalt und -sequenz wurden die entsprechenden Untersuchungen am porcinen C-Peptid durchgeführt (vergleiche dazu Abb. B. VI.1.).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
NH ₃ ⁺ -Glu-Ala-Glu-Asp-Leu-Gln-Val-Gly-Gln-Val-Glu											H
NH ₃ ⁺ -Glu-Ala-Glu-Ala-Pro-Gln-Ala-Gly-Ala-Val-Glu											P
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
-Leu-Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Ala-Gly-Ser-Leu-Gln											H
-Leu-Gly-Gly-Gly-Leu-Gly-								-Gly-Leu-Gln			P
23	24	25	26	27	28	29	30	31			
-Pro-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Ser-Leu-Gln-CO ₂ ⁻											H
-Ala-Leu-Ala-Leu-Glu-Gly-Pro-Pro-Gln-CO ₂ ⁻											P

Legende: H=humanes C-Peptid; P=porcines C-Peptid

Abb. B.VI.1.: Gegenüberstellung der Aminosäuresequenz von humanem und porcinem C-Peptid (Lit.44)

Das humane und das porcine C-Peptid stimmen in 20 Positionen miteinander überein. Beide Peptide enthalten je 7 Moleküle Glycin, das schwach bei $\lambda=240\text{nm}$ absorbiert (vergleiche B.VII.3.3.1.) Ferner enthalten beide Peptide die Aminosäuren Glutamin, Alanin, Leucin, Glutaminsäure, Valin und Prolin. Das humane C-Peptid be-

steht weiterhin aus den Aminosäuren Serin und Asparaginsäure; nur das porcine C-Peptid enthält Arginin in seiner Aminosäuresequenz. Beide Peptide enthalten keine aromatischen Aminosäuren, auch nicht die Aminosäure Tyrosin; beide Peptide absorbieren daher nicht bei $\lambda=276\text{nm}$.

B. VI.2. Reagentien und Instrumente

B. VI.2.1. Reagentien

Hierbei wurden alle in B.II.1.1. aufgeführten Reagentien mit Ausnahme des porcinen Kristall-Insulins verwendet. An dessen Stelle wurde synthetisches porcines C-Peptid der Hoechst AG in Frankfurt/M. benötigt (Synthese: Prof.Dr.Geiger).

B. VI.2.2. Glaswaren

vergleiche B. II.1.2.

B. VI.2.3. Meßgeräte

vergleiche B. II.1.3.

B. VI.2.4. Weitere Elektrogeräte

vergleiche B. II.1.4.

B. VI.2.5. Sonstiges

vergleiche B. II.1.5.

B. VI.3. Versuchsaufbau und laborchemische Synthese von
1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol

B. VI.3.1. Herstellung von 100ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2

Es wurde der in B. II.2.1. hergestellte Puffer verwendet.

B. VI.3.2. Herstellung von 0,1ml C-Peptidpufferlösung

Es wurde wie in B. II.2.2. vorgegangen. Anstelle von 1mg Schweineinsulin wurde 1mg porcines C-Peptid benutzt. Hinsichtlich des Löslichkeitsverhaltens in dem Guanidin-Phosphatpuffer ergab sich kein erkennbarer Unterschied.

B. VI.3.3. Herstellung einer 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzollösung (30mg/1ml gereinigtem Methanol)

vergleiche dazu B. II.2.3.

B. VI.3.4. Aktivierung des porcinen C-Peptids mittels 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol in methanolischer Lösung

B. VI.3.4.1. Vorbereitende Maßnahmen

vergleiche B. II.2.4.1.

B. VI.3.4.2. Aktivierung und Ätherextraktion

Es wurde wie in B. II.2.4.2. vorgegangen. Anstelle von 0,1ml Insulinpufferlösung wurden 0,1ml einer C-Peptidlösung (vergleiche B. VI.3.2.) verwendet.

Der nach der Ätherextraktion verbliebene Niederschlag an 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol war dunkelgelb; der in 8. II.2.4.2. aufgetretene Niederschlag war etwas heller gewesen. Ansonsten fand sich kein weiterer makroskopischer Unterschied.

8. VI.3.5. Kopplung von porcinem C-Peptid an Rinderalbumin

3. VI.3.5.1. Herstellung von 100ml Boratpuffer, pH 10

Es wurde der nach 8. II.2.5.1. hergestellte Puffer verwendet.

8. VI.3.5.2. Herstellung von 1ml Albuminpufferlösung

vergleiche dazu 8. II.2.5.2.

8. VI.3.5.3. Peptidkopplung

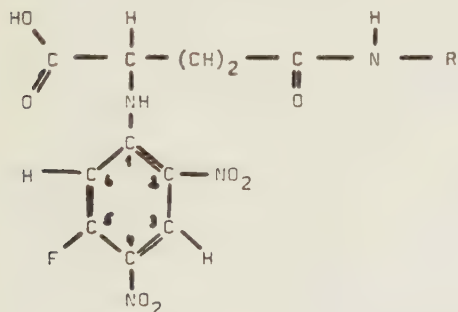
0,1ml Rinderalbuminpufferlösung wurden zu dem in 8. VI.3.4.2. entstandenen Niederschlag, der neben verschiedenen Salzen auch das 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol enthielt, pipettiert. Der gelbe Niederschlag löste sich spontan und vollständig in der Rinderalbuminpufferlösung und gab ihr eine grün-gelbliche Färbung. Auch nach fünfminütiger Zentrifugation bei 3000 U/min und einer Raumtemperatur von 23°C war kein Niederschlag am Boden des Reagenzglases zu erkennen.

Der Ansatz wurde etwa 10min lang unter dem Abzug stehen gelassen, um ein Verdampfen von Restäther zu gewährleisten. Anschließend wurde er im Dunkeln bei Raumtemperatur 24 Stunden lang aufbewahrt. Es fanden sich am Boden des Reagenzglases feste, weißliche Strukturen, die Lösung selbst war immer noch klar und von grün-gelblicher Färbung. Die Lösung und der weiße Niederschlag wurden voneinander getrennt und in 8. VII. einer physikalisch-chemischen Untersuchung unterzogen.

B. VI.3.6. Reaktionsmöglichkeiten des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols mit porcinem C-Peptid

1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol reagiert im alkalischen Milieu mit der nicht-protonierten, freien N^α-terminalen Aminogruppe der Glutaminsäure im porcinen C-Peptid zu 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol (Lit.40). Da porcines C-Peptid kein Cystein, Tyrosin oder Lysin enthält, sind weitere Bindungsmöglichkeiten an das 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol auszuschließen (Lit.41,42,43). Das entstandene Syntheseprodukt hätte demzufolge den aus Abb. B. VI.2. ersichtlichen Aufbau.

Die anschließende Kopplung des porcinen C-Peptids an das Rinderalbumin nach S. VI.3.5.3. erfolgt am C₅-Atom des Benzolringes im 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol unter Abspaltung der zweiten Fluorgruppe als Fluorwasserstoff. Die Reaktionsmöglichkeiten an dieser zweiten Fluorgruppe mit dem Rinderalbumin entsprechen dem in Lit.40-43 Gesagten.



R ≙ Position 2 bis 29 des porcinen C-Peptids
(vergleiche Abb. B. VI.1.)

Abb. B. VI.2.: Molekülstruktur des synthetisierten
1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols
(C-Peptid vom Schwein)

B. VII. Physikalisch-chemische Analyse des synthetisierten
1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

B. VII.1. Allgemeine Vorbemerkung

Das nach B. VI.3.5.3. hergestellte 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol löste sich spontan in 0,1ml Boratpuffer, pH 10 sowie in dem gleichen Volumen Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 als auch in 7 M Harnstofflösung, pH 8,4 (ungepuffert).

Mittels der lichtmikroskopischen Untersuchung sollte geprüft werden, ob sich in dem weißen Niederschlag außer auskristallisierten Mineralien auch amorphe Proteinanteile befinden.

Intention der Säulenchromatographie mit 125-Jod-C-Peptid und der sukzessiven spektralphotometrischen Untersuchung des synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols war dessen nähere Charakterisierung. Dabei sollten sich auch Rückschlüsse auf den etwaigen Bindungsanteil des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols an das Rinderalbumin ergeben.

B. VII.2. Mikroskopie

B. VII.2.1. Materialien

vergleiche dazu B. III.2.1.

B. VII.2.2. Durchführung

Der nach 24-stündiger Reaktionszeit des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols in B. VI.3.5.3. ausgefallene Niederschlag wurde mit einem Mikrospatel auf einen Objektträger überführt, mit 2-3 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung versetzt und mit einem Deckplättchen überschichtet. Bei der nachfolgenden licht-

mikroskopischen Betrachtung bei 80facher, 160facher sowie 320-facher Vergrößerung erkannte man nur weiße, transparente, polymorphe kristalline Strukturen; es fanden sich jedoch keinerlei amorphe Substanzen.

8. VII.2.3. Beurteilung

Bei dem untersuchten Niederschlag handelte es sich ausschließlich um die bei der Pufferherstellung verwendeten Salze. Demzufolge hatte sich die gesamte Menge des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in dem Boratpuffer gelöst und hatte daher mit dem Rinderalbumin unter äquimolarer Abspaltung von Fluorwasserstoff zu 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol reagieren können.

8. VII.3. Säulenchromatographische, spektralphotometrische und radiochemische Untersuchung des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

8. VII.3.1. Radioaktive Markierung des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols mit 125-Jod-C-Peptid

8. VII.3.1.1. Materialien

0,1ml Eppendorfpipette

8. VII.3.1.2. Reagentien

0,05ml 125-Jod-C-Peptidlösung

(Byk-Mallinckrodt, spezifische Aktivität: 18 000 Imp./min)

B. VII.3.1.3. Durchführung

Eine 0,1ml Eppendorfpipette wurde zweimal mit 0,05ml einer 125-Jod-C-Peptidlösung durchgespült. Dabei sollte die Innenseite des Pipettenansatzstückes mit einem dünnen Film dieser Lösung benetzt werden. Eine nach B. VI.3.2. hergestellte C-Peptidpufferlösung wurde vollständig in dieses Pipettenansatzstück angesaugt. Dabei vermischte sich die C-Peptidpufferlösung mit dem 125-Jod-C-Peptid. Die gesamte Lösung wurde in ein 7ml Kristallglas pipettiert und nach B. VI.3.4. - 3.6.3. an 1,5-Difluor-2,4-Dinitrobenzol und an Rinderalbumin chemisch gekoppelt.

Da sich bei der Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols nur bei der Ätherextraktion Verluste an 125-Jod-C-Peptid ergeben konnten, erfolgte nur dort eine weitere Aktivitätsbestimmung in einem γ -Szintillationszähler (vergleiche dazu B. VII.3.6.).

B. VII.3.2. Säulenchromatographie

B. VII.3.2.1. Allgemeine Vorbereitungen

Alle Vorbereitungen zur Säulenchromatographie sind aus B. III.4.1. - 4.1.5.2. zu entnehmen.

B. VII.3.2.2. Säulenchromatographie des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols über Sephadex G-50

Nach Absaugen der überschüssigen Harnstofflösung oberhalb der Sephadexsäule (vergleiche dazu B. III.4.2.3.) wurde das nach B. VI.3.5.3. synthetisierte 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol mit einer Eppendorfpipette auf die Säule übertragen. Die Chromatographie wurde daraufhin mit entgaster 7 M Harnstofflösung als Elutionsmittel durchgeführt.

Die einzelnen Fraktionen wurden nacheinander in 40 Polystyrol-Röhrchen aufgefangen und zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

B. VII.3.3. Photometrische Untersuchung des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda=276\text{nm}$ und bei $\lambda=340\text{nm}$

B. VII.3.3.1. Allgemeines

Weder humanes noch porcines C-Peptid enthält in seiner Aminosäuresequenz Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin. Im Gegensatz zu allen anderen Aminosäuren, die im fernen Ultraviolett ($\lambda < 220\text{nm}$) absorbieren, hat Tyrosin sein Absorptionsmaximum bei $\lambda=276\text{nm}$, Tryptophan bei $\lambda=280\text{nm}$ sowie Phenylalanin bei $\lambda=258\text{nm}$; Glycin absorbiert schwach bei 240nm (Lit.45,46). Alle Aminosäuren absorbieren nicht das sichtbare Licht ($400\text{nm} < \lambda < 800\text{nm}$). Eine Absorption bei $\lambda=276\text{nm}$ kann demzufolge in unserem Falle nur durch das Tyrosin im Rinderalbumin bedingt sein. Eine Absorption bei $\lambda=340\text{nm}$ deutet auf das Vorhandensein von Dinitrophenylresten hin. Da nach Tager (Lit.39) 99,9% des jeweiligen Peptids an den 5-Fluoro-2,4-Dinitrophenylrest gekoppelt werden, ist eine Absorption bei $\lambda=340\text{nm}$ hierbei gleichbedeutend mit dem Auftreten von C-Peptid. Nach Tager ist ebenso keine Freisetzung von Peptiden aus der sehr festen Bindung an den 5-Fluoro-2,4-Dinitrophenylrest unter den gegebenen Bedingungen zu erwarten.

B. VII.3.3.2. Durchführungen

Das nach B. VII.3.1. mit 125-Jod-C-Peptid markierte und nach B. VII.3.2. gelchromatographisch gereinigte 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol wurde fraktionsweise bei $\lambda=340\text{nm}$, dem Absorptionsmaximum des Dinitrophenylrestes, sowie bei $\lambda=276\text{nm}$, dem Absorptionsmaximum des Tyrosins, photometriert. Dazu wurde der Inhalt jedes einzelnen Fraktionsröhrchens (vergleiche

B. VII.3.2.2.) in eine Quarzküvette gegossen und die Absorption gegen 7 % Harnstofflösung am Zeissphotometer bestimmt. Zwischen den einzelnen Bestimmungen wurde die jeweilige Quarzküvette mit destillierter Wasser ausgespült und am Stickstoffgebläse getrocknet. Dies erwies sich als unbedingt erforderlich, da sich bereits nach zwei bis drei Messungen weißer Harnstoff am Küvettenrand ablagerte, der die Photometrie störend beeinflusste. Zwischen jeder der Messungen wurde ebenso die Transmission der Harnstofflösung, soweit sich eine Schwankung ergeben hatte, wieder auf 0% beziehungsweise 100% abgeglichen.

Zunächst wurde bei $\lambda=340\text{nm}$ photometriert. Die entsprechenden Extinktionswerte sind in Tab. B. VII.1. zusammengefaßt aufgeführt.

Anschließend wurde der Wellenlängenbereich auf $\lambda=276\text{nm}$ umgeschaltet und die UV-Lampe in Betrieb gesetzt. Nach 20 Minuten konnte mit der Messung begonnen werden. Die dabei erhaltenen Extinktionswerte sind aus Tab. B. VII.2. ersichtlich.

In Abb. B. VII.1. und Abb. B. VII.2. sind die Ergebnisse der beiden photometrischen Bestimmungen in Form von Strichdiagrammen graphisch dargestellt.

B. VII.3.4. Absorptionsspektrum des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

B. VII.3.4.1. Allgemeines

Wie aus Abb. B. VII.1. und Abb. B. VII.2. ersichtlich, befindet sich sowohl bei Fraktionsnummer 11 als auch bei Fraktionsnummer 29 ein relatives Extinktionsmaximum. Dabei handelt es sich bei Fraktionsnummer 11 um die Maximalmenge des Ausschlußvolumens und bei der Fraktionsnummer 29 um die geringere Maximalmenge des in dem Sephadexgel verbliebenen Retentionsvolumens. Daher wurden in B. VII.3.4.2. nur diese beiden Fraktionen spektralphotometrisch untersucht.

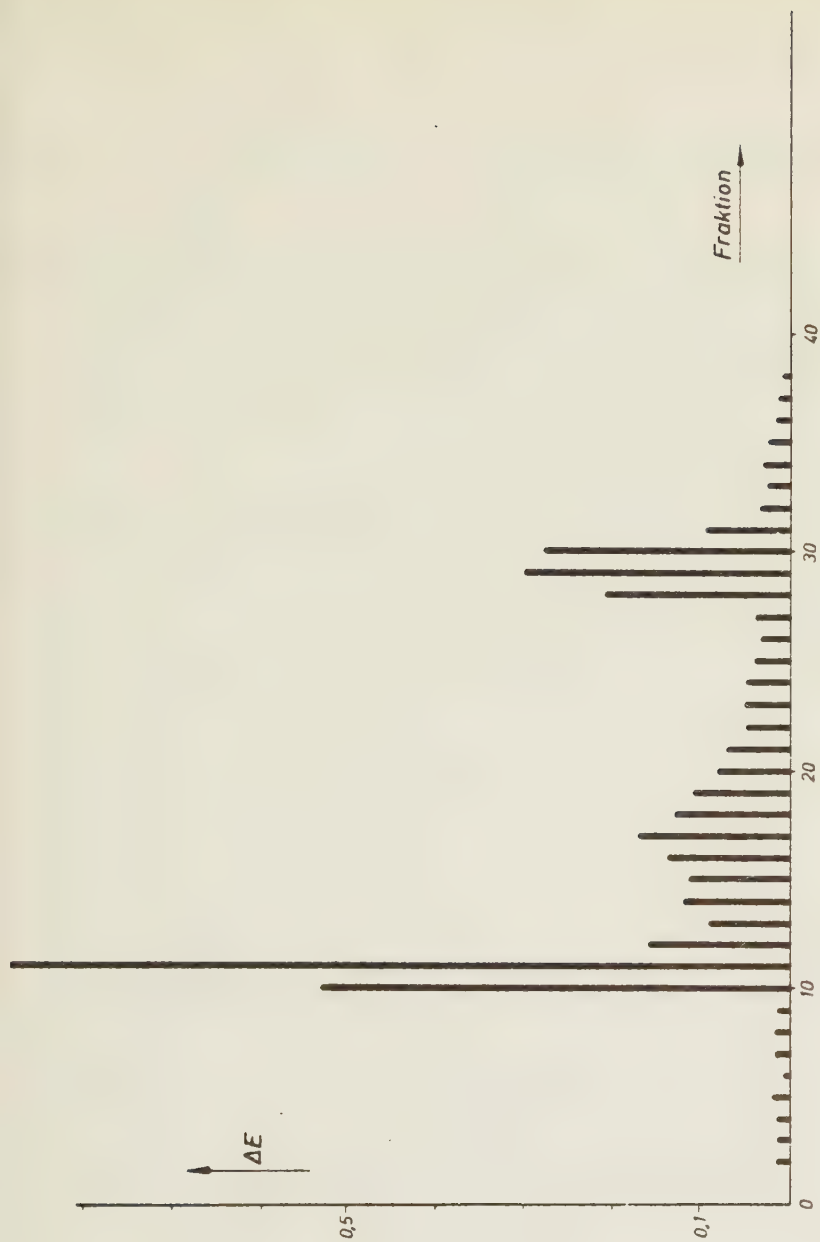


Abb. B.VII.1.: Photometrische Bestimmung des gelchromatographisch über Sephadex G-50 gereinigten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 340\text{nm}$

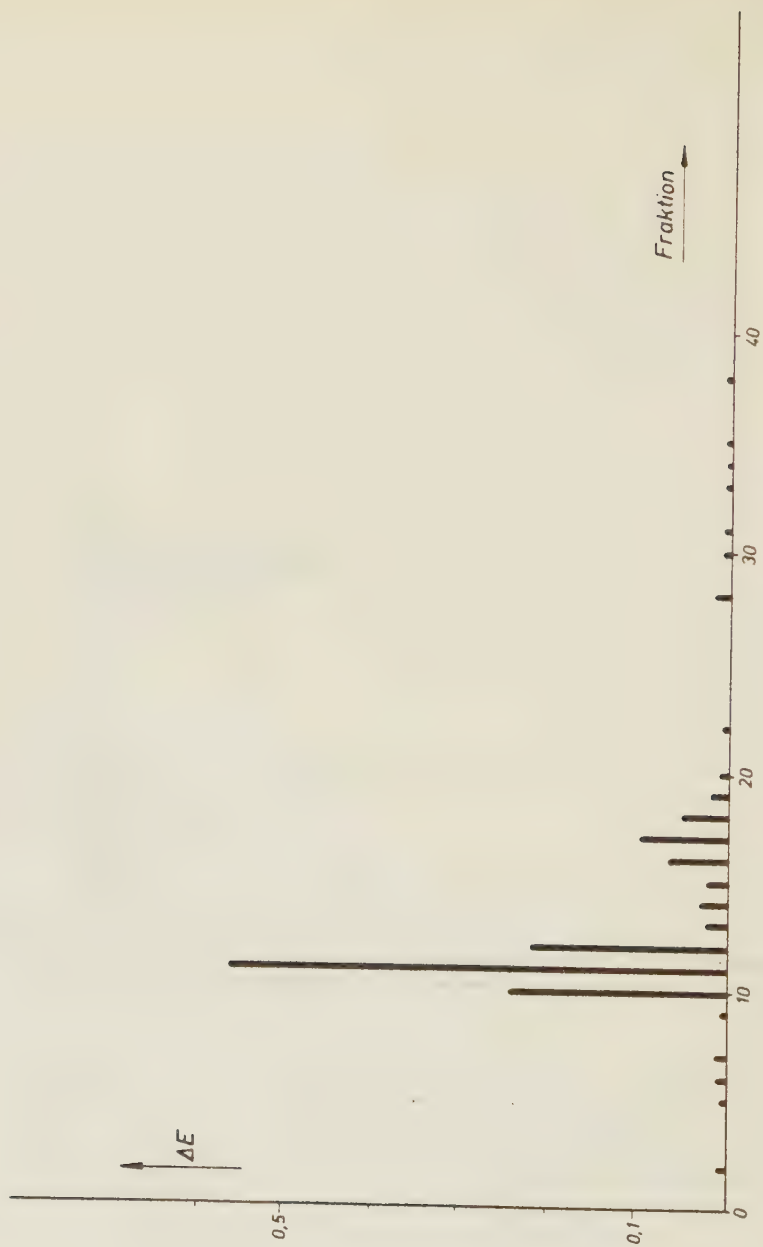


Abb. B.VII.2.: Photometrische Bestimmung des gelchromatographisch über Sephadex G-50 gereinigten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl 1-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda = 276\text{nm}$

B. VII.3.4.2. Durchführung der spektralphotometrischen Untersuchung

In einem Zeissphotometer wurden die Extinktionen der nach B. VII.3.2.2. erhaltenen Fraktionen 11 und 29 spektralphotometrisch von $\lambda=220\text{nm}$ bis $\lambda=500\text{nm}$ bestimmt. Es wurden Quarzküvetten verwendet und die einzelnen Extinktionsbestimmungen gegen 7 % Harnstofflösung durchgeführt. Die dabei erhaltenen Extinktionswerte für die Fraktionen Nr. 11 und Nr. 29 sind aus Tab. B. VII.3. ersichtlich und in Abb. B. VII.3. graphisch dargestellt.

B. VII.3.5. Radiochemische Untersuchung des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

B. VII.3.5.1. Materialien

γ -Szintillationszähler: Nuclear Enterprise,
NE 1600 Data Dynamics
PPN-Röhrchen, Art.-Nr. 115201
Greiner, Labortechnik, Nürtingen

B. VII.3.5.2. Durchführung

Die Fraktionen 1 bis 40 des nach B. VII.3.1.3. mit 125-Jod-C-Peptid markierten und nach B. VII.3.2.2. gelchromatographisch gereinigten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols wurden in PPN-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden ihre Aktivitäten an 125-Jod in einem vollautomatischen γ -Szintillationszähler bestimmt. Tab. B. VII.4. gibt Auskunft über die dabei gemessenen Aktivitäten der Fraktionen 1 bis 40; aus Tab. B. VII.5. ist der Anteil des 125-Jod-C-Peptids am Ausfluß- und Retentionsvolumen ersichtlich. Eine graphische Darstellung erfolgte in Abb. B. VII.4.



Abb. B.VII.3.: Absorptionsspektren der mittels Gelchromatographie über Sephadex G-50 gewonnenen Fraktionen Nummer 11 und 29 des aktivierten C-peptids

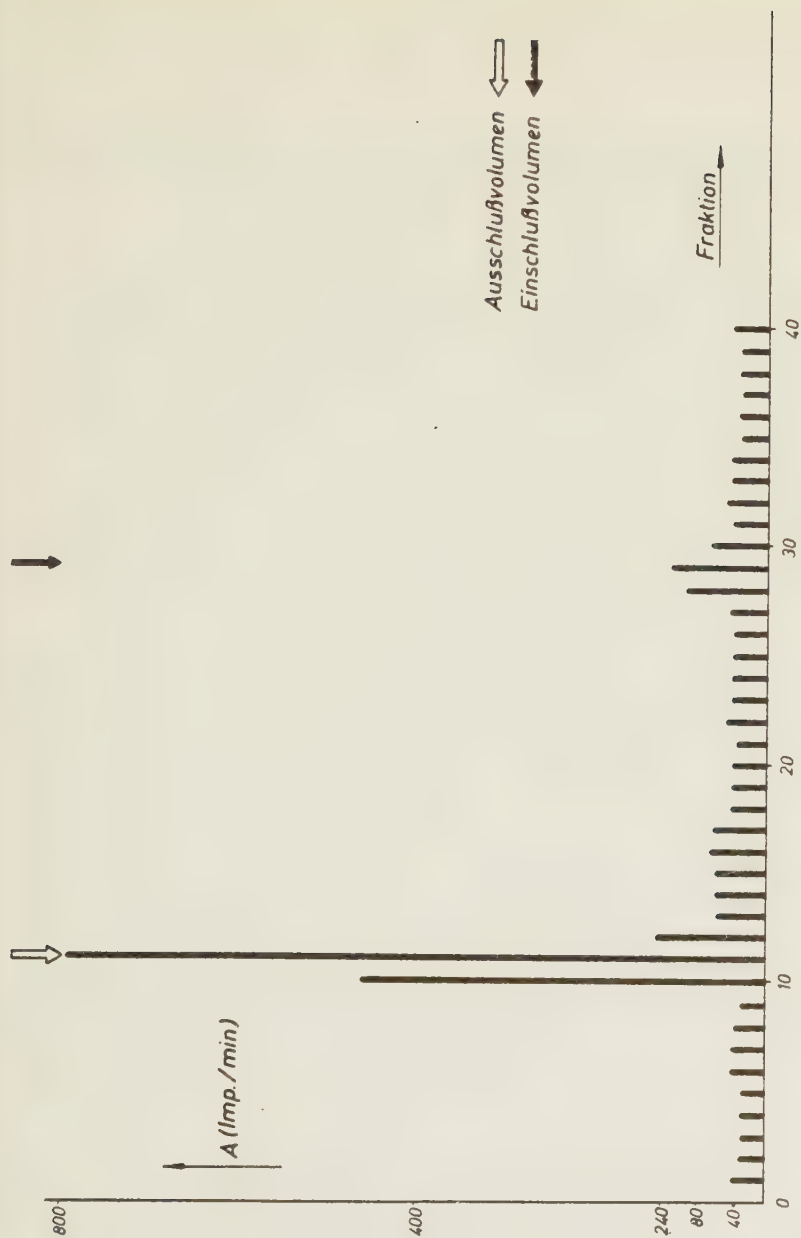


Abb. B.VII.4.: Radiochemische Meßwerte des über Sephadex G-50 gleichchromatographisch gereinigten und mit ^{125}I -Jod-C-Peptid markierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

B. VII.3.6. Quantifizierung der Radioaktivität in der Ätherfraktion

B. VII.3.6.1. Allgemeines

Bei der Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols konnten lediglich bei der Ätherextraktion auch höhermolekulare Inhaltsstoffe des Reaktionsansatzes aus diesem entfernt werden. Daher wurde nach B. VII.3.6.3. die zur jeweiligen Ätherextraktion verwendete Menge an Diäthyläther auf ihren Gehalt an Radioaktivität untersucht.

C-Peptid, ein saures Polypeptid, ist nur sehr schlecht im apolaren Diäthyläther löslich, jedoch kann elementares ^{125}Jod sowie $^{125}\text{-Jod-C-Peptid}$ über die Löslichkeit der wässrigen Phase in Äther in diesen hineingelangen.

B. VII.3.6.2. Materialien

vergleiche B. VII.3.5.1.

B. VII.3.6.3. Durchführung

Nach jeder einzelnen Extraktion wurde der hierfür verwendete Diäthyläther in ein PPN-Röhrchen gegossen - der Äther hatte immer noch eine Temperatur von unter 0°C und war daher nur mäßig flüchtig - und die darin vorhandene Radioaktivität anschließend in einem γ -Szintillationszähler bestimmt. Das Ergebnis der einzelnen Aktivitätsbestimmungen geht aus Tab. B. VII.6. hervor.

B. VII.3.7. Zusammenfassung und Beurteilung

Die lichtmikroskopische Untersuchung des bei der Synthese von

1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol aufgetretenen weißen Niederschlag ergab eindeutig, daß es sich dabei nur um Salzkristalle, jedoch nicht auch um Proteinstrukturen handelt.

Die gelchromatographische Untersuchung über Sephadex G-50 sowie die sukzessiv durchgeführte spektralphotometrische Bestimmung des synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols ergab: Mehr als zwei Drittel des Syntheseproduktes wandert im Ausschlußvolumen und zeigt in der photometrischen Untersuchung eine maximale Absorption sowohl bei $\lambda=340\text{nm}$ (Absorptionsmaximum des Dinitrophenylrestes und hier gleichbedeutend mit dem Auftreten von C-Peptid; vergleiche dazu auch B. VII.3.3.1.) als auch bei $\lambda=276\text{nm}$ (Absorptionsmaximum des Tyrosins im Rinderalbumin; vergleiche dazu auch die Eichkurve des Rinderalbumins in S. III.4.6.).

Da bei der Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols die Aktivierung aufgrund des Aminosäuregehaltes des C-Peptids nur an der N^α-terminalen Aminogruppe erfolgen konnte, sind auch bei der Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols keine Quervernetzungen in Form von C-Peptid/Albuminbrückenbindungen zu erwarten. Eine Kopplung an das Rinderalbumin kann außer an dessen N^α-terminalen Aminogruppe auch an Lysin-, Tyrosin- und Cysteinpositionen des Polypeptids erfolgen (Lit.40-43). Quervernetzungen sind auch dadurch nicht zu erwarten. Außerdem trat hierbei, im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Schweineinsulin, kein unlöslicher Niederschlag auf. Schließt man daher Quervernetzungen der einzelnen C-Peptidmoleküle untereinander aus, so kann an 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol gebundenes C-Peptid mit einem Molekulargewicht von 3301^+ , ein Wert, der bei

⁺ C-Peptid, MG 3117 (Lit.44)

1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol, MG 204

Fluorwasserstoff (HF), MG 20

C-Peptid + 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol - HF

----> 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol (MG 3301)

weiten unter dem Ausschlußwert der mit Sephadex G-50 beschickten Chromatographiesäule von MG 40 000 bis MG 60 000 liegt, nur dann im Ausschlußvolumen erscheinen, wenn es gleichzeitig am Rinderalbumin gekoppelt oder aber adsorbiert vorliegt. Eine Adsorption ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da die vorherige Gelchromatographie zur Vermeidung dieser Störmöglichkeit mit 7 M Harnstofflösung als Elutionsmittel durchgeführt worden ist (Lit.39).

Weniger als ein Drittel des Syntheseproduktes wandert bei der Chromatographie im Einschlußvolumen und zeigt eine signifikante Absorption bei $\lambda=340\text{nm}$, jedoch erwartungsgemäß keinerlei Absorption bei $\lambda=276\text{nm}$. Dabei handelt es sich um den nicht an Rinderalbumin gekoppelten Anteil des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols.

Das Absorptionsspektrum der Fraktion 11 (maximales Ausschlußvolumen) ist gekennzeichnet durch das Absorptionsmaximum des Dinitrophenylrestes bei $\lambda=340\text{nm}$ sowie durch ein weiteres relatives Maximum bei $\lambda=276\text{nm}$, das durch das Absorptionsmaximum der Aminosäure Tyrosin im Rinderalbumin hervorgerufen ist. Der Kurvenverlauf ist durch einen starken Anstieg der Extinktion bei abnehmender Wellenlänge bis auf gemessene $\lambda=220\text{nm}$ gekennzeichnet. Dieser Extinktionsanstieg ist durch das Absorptionsvermögen der meisten Aminosäuren im fernen Ultraviolett bedingt und daher auch konzentrationsabhängig. Da das Rinderalbumin aus vielen Aminosäuren (MG 68500) aufgebaut ist, kommt es hierbei auch zu einer starken Absorption innerhalb des Ultravioletts. Da die Aminosäuren im sichtbaren Wellenlängenbereich (fast) nicht absorbieren, kommt es hier zu einem starken Extinktionsabfall bis auf $\Delta E=0$.

Das Absorptionsspektrum der Fraktion 29 (maximales Einschlußvolumen) ist gekennzeichnet durch ein weniger deutliches Absorptionsmaximum des Dinitrophenylrestes bei $\lambda=340\text{nm}$ mit einer nachfolgenden Plateaubildung der Extinktion von $\lambda=340\text{nm}$ bis $\lambda=400\text{nm}$. Diese Plateaubildung ist möglicherweise durch den zusätzlichen

Salzgehalt des Retentionsvolumens bedingt. Bei $\lambda = 276\text{nm}$ findet sich erwartungsgemäß keine signifikante Absorption, da bei einem Ausschlußvolumen von MG 60 000 kein Albumin mit einem MG von 68 500 retiniert werden konnte. Der geringere Anstieg der Extinktion im fernen Ultraviolett ist wahrscheinlich durch den geringen Aminosäuregehalt des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols bedingt.

Bei der radiochemischen Untersuchung des gelchromatographierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols findet sich in Übereinstimmung mit den photometrischen Ergebnissen bei Fraktion 11 die höchste Menge an albumingebundenem 125-Jod-C-Peptid. Weiterhin findet sich bei Fraktion 29 die höchste Menge an ungebundenem 125-Jod-C-Peptid. Summiert man die gemessenen Aktivitäten pro Minute des Ausschlußvolumens in Fraktion 11 bis 17 sowie die des Retentionsvolumens in Fraktion 28 bis 30, so ergibt sich, daß etwa 89,4% des 125-Jod-C-Peptids (und damit auch des unmarkierten C-Peptids) im Ausschlußvolumen und lediglich 10,6% im Retentionsvolumen nachweisbar sind. Demzufolge werden bei Verwendung von 1mg Rinderalbumin sowie von 1mg porcinem C-Peptid bei der Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols etwa 89,4% ($\pm 0,89\text{mg}$) des C-Peptids an das Albumin gebunden.

Die Gesamtmenge des bei der radiochemischen Untersuchung verwendeten 125-Jod-C-Peptids errechnet sich aus der Gesamtmenge der Aktivitäten der Tab. 8. VII.5. mit 1530 ± 165 Imp./min sowie aus der Aktivität des Diäthyläthers bei der 1. Ätherextraktion mit 91 ± 20 Imp./min. Dabei blieb der geringere Aktivitätsabfall des 125Jods ($H_{1/2}$: 60 Tage) innerhalb von 30 Stunden (benötigter Zeitraum für Peptidkopplung, Chromatographie und Photometrie) unberücksichtigt; außerdem wirkt er sich auf das Ausschluß- und auf das Einschlußvolumen gleichermaßen aus. Die Aktivität des insgesamt verwendeten 125-Jod-C-Peptids betrug demzufolge 1621 ± 185 Imp./min. Die bei der Ätherextraktion verlorene Aktivitätsmenge lag damit bei etwa 5,6% $[(91:1621) \times 100 = 5,6]$.

Da dieser Aktivitätsverlust zum größten Teil auf der Diffusion von ^{125}Jod in die Ätherphase beruht, sind die Verluste an C-Peptid bei der Ätherextraktion von untergeordneter Bedeutung, denn die tatsächlichen Verluste an C-Peptid sind demzufolge noch wesentlich geringer zu veranschlagen.

3. VII.3.8. Ergänzung

Eine Verlängerung der Reaktionszeit bei der Peptidkopplung in B. VI.3.5.3. auf 36 Stunden oder auf 48 Stunden führte zu den gleichen Ergebnissen bei der physikalisch-chemischen Analyse; eine Erhöhung des Bindungsanteiles von 1-C-Peptidyl-S-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol an Rinderalbumin konnte dadurch nicht erzielt werden.

8. VIII. Laborchemische Synthese von 1-C-Peptidyl-S-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol unter Verwendung von humanem C-Peptid

9. VIII.1. Reagentien und Instrumente

9. VIII.1.1. Reagentien

Hierbei wurden alle in B. II.1.1. aufgeführten Reagentien mit Ausnahme des Kristall-Insulins vom Schwein verwendet. An dessen Stelle wurde humanes C-Peptid der Hoechst AG in Frankfurt/M. benötigt (Synthese: Prof.Dr.Geiger).

9. VIII.1.2. Glaswaren

vergleiche B. II.1.2.

9. VIII.1.3. Meßgeräte

vergleiche B. II.1.3.

B. VIII.1.4. Weitere Elektrogeräte

vergleiche B. II.1.4.

B. VIII.1.5. Sonstiges

vergleiche B. II.1.5.

B. VIII.2. Versuchsaufbau zur Synthese von 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol

B. VIII.2.1. Herstellung von 100ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2

vergleiche B. II.2.1.

B. VIII.2.2. Herstellung von 0,1ml C-Peptidpufferlösung

Es wurde wie in B. II.2.2. vorgegangen. Anstelle von 1mg porcinem Insulin wurde 1mg humanes C-Peptid benutzt. Hinsichtlich des Löslichkeitsverhaltens in dem Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 ergab sich dabei kein erkennbarer Unterschied.

B. VIII.2.3. Herstellung einer Lösung bestehend aus 90mg 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol und 3ml gereinigtem Methanol

vergleiche dazu B. II.2.3.

B. VIII.2.4. Aktivierung des humanen C-Peptids mittels
1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol in methano-
lischer Lösung

B. VIII.2.4.1. Vorbereitende Maßnahmen

vergleiche B. II.2.4.1.

B. VIII.2.4.2. Aktivierung und Ätherextraktion

Es wurde wie in B. II.2.4.2. vorgegangen. Anstelle von 0,1ml Insulinpufferlösung wurden 0,1ml der in B. VIII.2.2. hergestellten C-Peptidpufferlösung verwendet.

Der nach der Ätherextraktion verbliebene Niederschlag erschien makroskopisch wie der in B. VI.3.4.2. erhaltene Niederschlag bei Verwendung von porcinem C-Peptid.

B. VIII.2.5. Kopplung von humanem C-Peptid an Rinderalbumin

B. VIII.2.5.1. Herstellung von 100ml di-Natriumtetraboratpuffer,
pH 10

vergleiche B. II.2.5.1.

B. VIII.2.5.2. Herstellung von 1ml Albuminpufferlösung

vergleiche B. II.2.5.2.

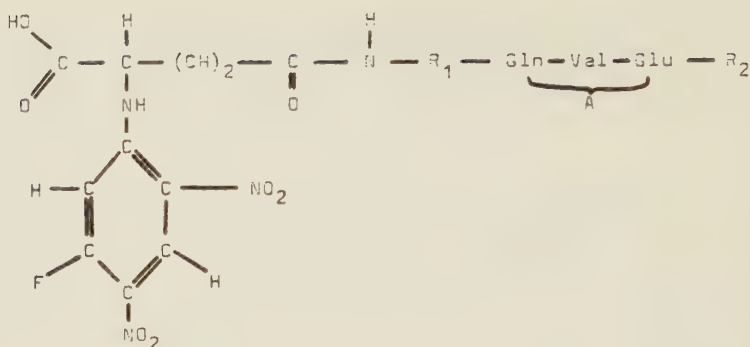
B. VIII.2.5.3. Peptidkopplung

Durchführung und Ergebnis entsprechen der Darstellung in

B. VI.3.5.3. Die physikalisch-chemische Untersuchung entfällt. Das 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol wurde nach B. VIII.3. mit Freundschem Adjuvant emulgiert und nach B. IX.3. zur Immunisierung von 6 Kaninchen verwendet.

B. VIII.2.6. Reaktionsmöglichkeiten des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols mit humanem C-Peptid

1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol reagiert im alkalischen Milieu mit der nicht-protonierten, freien N^α-terminalen Aminogruppe der Glutaminsäure im humanen C-Peptid zu 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol (Lit. 40). Da auch humanes C-Peptid kein Cystein, Tyrosin oder Lysin in seiner Aminosäuresequenz enthält, sind weitere Bindungsmöglichkeiten an das 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol auszuschließen (Lit. 41-43). Daraus ergibt sich, daß die C-Peptidaktivierung mit dem 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol nur an der freien, N^α-terminalen Aminogruppe erfolgt; somit resultiert auch keine Blockierung eines potentiellen Antigenlocus, denn nach Yanaihara (Lit.13) ist das N-terminale Ende des C-Peptids für dessen Antigenität ohne entscheidende Bedeutung. Das entstandene Syntheseprodukt nach B. VIII.2.4.2. hätte demzufolge den **aus Abb. 8. VIII. 1. ersichtlichen Aufbau**. Die anschließende Kopplung des humanen C-Peptids an das Rinderalbumin nach B. VIII.2.5.3. erfolgt am C₅-Atom des Benzolringes im 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol unter Abspaltung der zweiten Fluorgruppe als Fluorwasserstoff. Die Reaktionsmöglichkeiten entsprechen dem in Lit.40-43 Gesagten.



$R_1 \triangleq$ Position 2 bis 8 des humanen C-Peptids

$R_2 \triangleq$ Position 12 bis 31 des humanen C-Peptids

$A \triangleq$ zur Antikörpergewinnung gegen humanes C-Peptid unbedingt erforderliche Antigen determinante in Position 9 bis 11 des humanen C-Peptids entsprechend der Position 41 bis 43 des Human-Proinsulin-C-Peptids (Lit.13)

Abb. B. VIII.1.: Molekülstruktur des synthetisierten
1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols
(C-Peptid vom Menschen)

B. VIII.3. Herstellung eines C-Peptidimpfstoffes zur Immunisierung von 6 Kaninchen

B. VIII.3.1. Allgemeines

6 Kaninchen erhielten im vierzehntägigen Abstand insgesamt viermal die Gesamtmenge des nach B. VIII.2.5.3. synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols. Dazu wurde das Syntheseprodukt nach Verdünnung mit 0,9%iger Natriumchloridlösung zu gleichen Teilen mit Freundschem Adjuvant emulgiert, um dadurch die Resorptionsgeschwindigkeit des Impfstoffes aus der Injektionsstelle des jeweiligen Kaninchens zu verzögern und um auf diese Art und Weise einen Depoteffekt zu erzielen.

B. VIII.3.2. Materialien

Eppendorfpipetten

10ml Spritzen, Injekt Luer, E.Braun, Melsungen AG

Medojekt Luer, Nr. 1, 90mm x 40mm

Verschlußstopfen von Monovetten

Art. 920, Walter Sarstedt, Laborartikel

Mikroemulgator, Ultra-Turrax^R,

Typ Tp 18/10 mit Thyristor Regler

von Janke & Kunke AG, Staufen i. Breisgau

Mikrospatel

B. VIII.3.3. Reagentien

Freund's Adjuvant (complete) R 096013

Grand Island Biological, Company Grand Island N.Y. USA

Freund's Adjuvant (incomplete) A 196122

Grand Island Biological, Company Grand Island N.Y. USA

Kochsalzlösung 0,9%, Pharma Hameln, Hameln/Weiser

B. VIII.3.4. Emulgierung des 1-C-Peptidyl-5-A'lguninyl-2,4-Dinitrobenzols mit Freund'schem Adjuvant

Das nach B. VIII.2.5.3. gewonnene lösliche Syntheseprodukt wurde mittels Eppendorfpipette sorgfältigst auf zwei 10ml Spritzen, die jeweils an ihrem Kanülenansatzstück mit einem Monovettenverschlußstopfen verschlossen worden waren, zu gleichen Teilen verteilt. In jede der beiden Spritzen wurde 0,9% NaCl-Lösung bis zu einem jeweiligen Gesamtvolumen von 2,5ml pipettiert und anschließend 2,5ml Freund'sches Adjuvant hinzugefügt. Zur ersten Immunisierung wurde komplettes, zu allen weiteren Boosterungen inkomplettes Freund'sches Adjuvant verwendet. Das mit abgetöteten Tuberkelbakterien versehene komplette Freund'sche Adjuvant wurde dabei zur Stimulierung des Immunsystems bei den Kaninchen verwendet.

Die weiteren Ausführungen entsprechen dem in B. II.3.4. am Beispiel des porcinen Insulins Gesagten.

In diesem Zusammenhang sei insbesondere auf die Abbildungen B. II.3.3. - 3.5. verwiesen.

Die dabei gewonnene Emulsion wurde unverzüglich zur Immunisierung der 6 Kaninchen herangezogen.

B. IX. Immunisierung von Kaninchen mit 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol

B. IX.1. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich männliche Jungtiere (Klein Silber gelb) mit einem Gewicht von 1300g bis 2300g verwendet. Diese wurden nummeriert und vor jeder subkutanen Injektion des nach B. VIII.3.4. hergestellten fertigen Impfstoffes mit einem Rasiermesser am Rücken sowie im Nacken kahlgeschoren.

B. IX.2. Injektionsmaterial

vergleiche B. IV.2.

Injiziert wurde das auf zwei 10ml Spritzen verteilte 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol (vergleiche B. VIII.3.4.).

B. IX.3. Injektionstechnik und Injektionsintervall

6 Kaninchen erhielten eine einmalige intramuskuläre Injektion von jeweils 0,5ml Pertussis-Stammssuspension zur Stimulierung des Immunsystems. Anschließend wurde bei Kaninchen Nummer 1 bis 6 das 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol in Form von multiplen subkutanen Quaddeln injiziert. Dabei erhielt jedes der

sechs Kaninchen maximal 0,33mg 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol (Diese Menge ergibt sich aus der Summe von 1mg humanem C-Peptid und 1mg Rinderalbumin geteilt durch 6 Kaninchen; die wesentlich geringere Menge des Dinitrophenylrestes wurde dabei rechnerisch vernachlässigt.).

Im jeweils 14tägigen Abstand erfolgten drei weitere Boosterungen der sechs Kaninchen mit der gleichen Menge an C-peptidhaltigem Antigen.

Die zur Injektion vorgesehenen Hautpartien wurden mit einem Alkoholtupfer gereinigt; ein steriles Vorgehen war jedoch aufgrund des unsterilen Impfstoffes im voraus ausgeschlossen. Bei einem Teil der Kaninchen traten daher auch Hautinfektionen mit kleineren Ulzera auf, die sich jedoch symptomatisch mittels Sepanthen^RSalbe (Panthenol) beherrschen ließen.

B. IX.4. Blutentnahme zur Bestimmung des Antikörpertiters

B. IX.4.1. Materialien

vergleiche B. IV.4.1.

B. IX.4.2. Durchführung

Alle 6 Kaninchen wurden jeweils an einem ihrer Ohrläppchen mit Finalgoncreme bestrichen. Nach zehnmündiger Einwirkungszeit wurde eine Ohrvene mittels digitaler Kompression gestaut und anschließend mit einem schnellen Scherenschnitt inzidiert. Die ersten beiden Blutstropfen wurden verworfen, das nachströmende Blut jedoch in nummerierte Eppendorfküvetten aufgefangen. Die dabei je Tier aufgefangene Blutmenge schwankte zwischen fünf und acht Blutstropfen.

3. IX.4.3. Serumgewinnung

Die von 1 bis 6 nummerierten, mit Kaninchenblut gefüllten Eppendorfküvetten wurden, nachdem das darin befindliche Blut geronnen war, 10min bei 2400 U/min im Mikro Rapid zentrifugiert, das abgetrennte Kaninchenserum mittels Eppendorfpipette aufgesaugt und auf seinen Antikörpertiter hin untersucht (vergleiche 8. X.1.3.).

2. IX.5. Entblutung der Kaninchen zur Serumgewinnung

3. IX.5.1. Materialien

250ml Zentrifugenglas, Schott Mainz
vergleiche auch 9. IV.5.1.

3. IX.5.2. Durchführung

Die Entblutung der durch Nackenschlag narkotisierten Kaninchen erfolgte wie in 8. IV.5.2. beschrieben durch Skalpellinzision der großen Halsgefäße. Das herausströmende Blut wurde in nummerierte 250ml Zentrifugengläser aufgefangen. Die dabei gewonnene Blutmenge schwankte je nach Kaninchen zwischen 35ml und 46ml.

3. IX.5.3. Serumgewinnung

Die Gewinnung von Kaninchenserum erfolgte nach dem in 8. IV.5.3. aufgezeichneten Prinzip.

3. IX.6. Ergänzung

Die Gesamtdauer dieser Tierversuchsserie belief sich auf 8 Wochen. Nach 7 Wochen wurde Kaninchen Nummer 1 notgeschlachtet;

es befand sich in einem reduzierten Allgemeinzustand und wurde aus diesem Grunde eine Woche früher als die übrigen fünf Kaninchen entblutet.

B. X. Bestimmung des Titers an C-Peptidantikörpern im Kaninchen-serum mittels Radioimmunoassay

B. X.1. Kurzbeschreibung der Bestimmungsmethode

B. X.1.1. Materialien

Eppendorfpipetten

PPN-Röhrchen, Art.-Nr. 115201

Greiner, Labortechnik, Nürtingen

Zentrifuge und Vortex-Mixer

Absauggerät

γ -Szintillationszähler: Nuclear Enterprise NS 1600

B. X.1.2. Reagentien

125-J-C-Peptidlösung

Puffer

Ziegenantikaninchen-Gammaglobulin

B. X.1.3. Durchführung

Die Seren der Kaninchen Nr. 1 bis 6 wurden mit C-Peptidpuffer 1:100 verdünnt. Aus jeder dieser sechs Verdünnungen wurden jeweils 0,1ml in ein nummeriertes PPN-Röhrchen pipettiert. Nach Zugabe von jeweils 0,1ml 125-Jod-C-Peptidlösung sowie 0,2ml Puffer wurde der entsprechende Ansatz 72 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 0,1ml Ziegenantikaninchen-Gammaglobulin hinzugefügt, der Ansatz heftig auf einem Vortex-Mixer ver-

risiert und 24 Stunden lang bei 4°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann bei Raumtemperatur (23°C) und 2000 U/min lang zentrifugiert; schließlich wurde der verbleibende Überstand quantitativ abgesaugt. Die in den PPI-Röhrchen verbliebene Restaktivität an ^{125}I -Jod wurde in einem γ -Scintillationszähler gemessen.

B. X.2. Ergebnisse

B. X.2.1.1. Bestimmung des Antikörpertiters nach 6 Wochen

Die nach B. IX.4.3. beschriebene Methode zur Serumgewinnung bei Kaninchen erbrachte bei der radiochemischen Untersuchung, 6 Wochen nach der ersten Immunisierung der Kaninchen mit dem nach B. VIII.2.5.3. synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol, das aus Tab. B. X.1. ersichtliche Ergebnis. Eine graphische Darstellung erfolgte in Abb. B. X.1.

B. X.2.1.2. Beurteilung

Sechs Wochen nach der dreimaligen Injektion von 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol in vierzehntägigem Abstand mit einer Gesamtmenge von 0,5mg C-Peptid pro Kaninchen ($3 \times 1/6\text{mg}$ C-Peptid/Tier) kommt es bei allen sechs Kaninchen zu einer geringen Antikörperbildung gegen humanes C-Peptid.

B. X.2.2.1. Bestimmung des Antikörpertiters nach Entblutung der Kaninchen 8 Wochen nach Versuchsbeginn

Die nach B. IX.4.3. beschriebene Methode zur Serumgewinnung bei Kaninchen erbrachte bei der radiochemischen Untersuchung, 8 Wochen nach der ersten Immunisierung der Kaninchen mit dem nach B. VIII.2.5.3. synthetisierten 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Di-

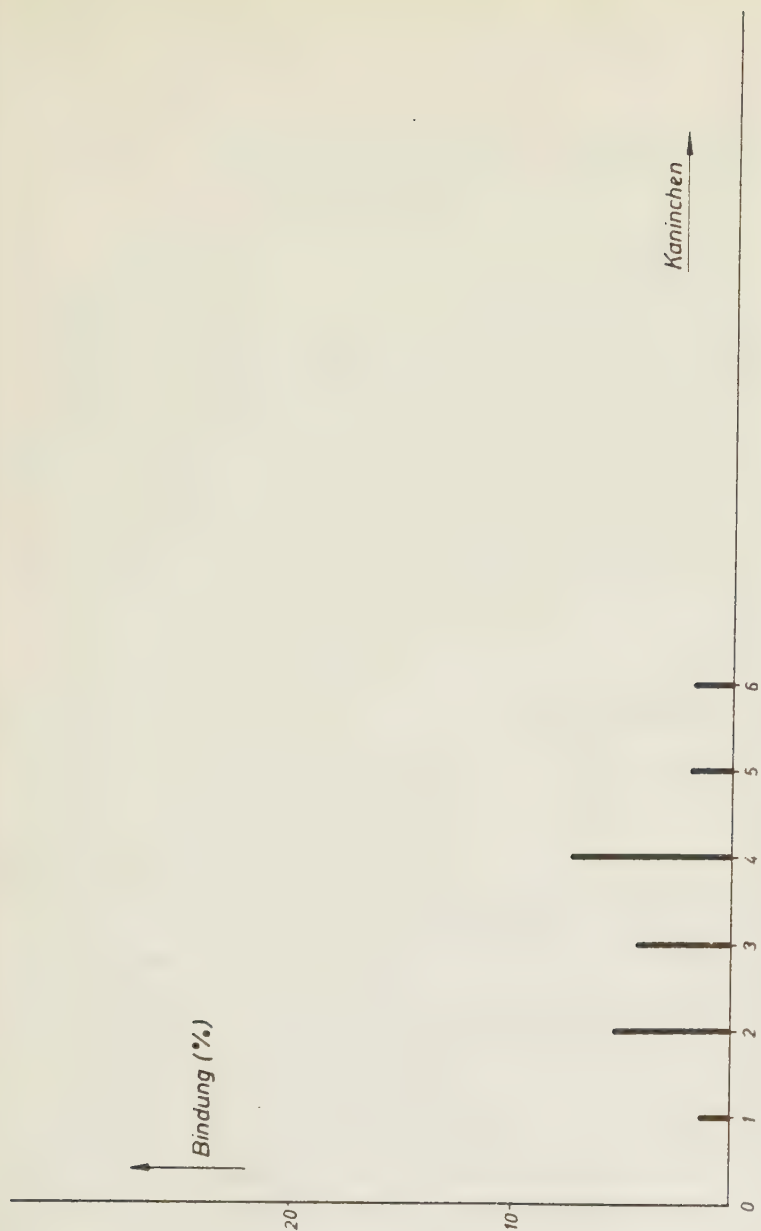


Abb. B.X.1.: Prozentuale Bindung der C-Peptidantikörper an den Tracer nach dreimaliger Injektion von humanem C-Peptid mit einer Gesamtmenge von 0,5 mg C-Peptid/Kaninchen Serumverdünnung 1 : 100

nitrobenzol, das aus Tab. 8. X.2. ersichtliche Ergebnis. Eine graphische Darstellung erfolgte in Abb. 8. X.2.

B. X.2.2.2. Beurteilung

Acht Wochen nach der viermaligen Injektion von 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol in vierzehntägigem Abstand mit einer Gesamtmenge von 0,86mg C-Peptid pro Kaninchen (4x1/6mg C-Peptid/Tier) kommt es bei allen Kaninchen zu einem weiteren Titeranstieg. Der höchste Titer an C-Peptidantikörpern findet sich dabei bei Tier Nr. 2, dessen Serum 18,9% des Tracers bei einer Verdünnung von 1:100 bindet. Leider stand kein weiteres humanes C-Peptid zur Verfügung, sodaß weitere Boosterungen ausgeschlossen waren und kein noch höherer Antikörpertiter erzielt werden konnte.

B. XI. Zusammenfassung

Die von Tager (Lit.39) beim Glucagon beschriebene Methode zur Kopplung des Haptens an Rinderalbumin wurde zunächst in einem Modellversuch am Schweineinsulin in B. II.1. - 2.5.3. versucht nachzuvollziehen. Nach Aktivierung von 1mg in Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 gelösten Schweineinsulin mit 15mg 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol in methanolischer Lösung entstand zunächst 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol. Das Überschüssige 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde mittels eisgekühltem Diäthyläther extrahiert. Der verbliebene, gelbe Niederschlag an 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol wurde mit in Boratpuffer, pH 10 gelöstem Albumin (1mg/ml) versetzt. Jedoch auch nach 24-stündiger Reaktionszeit des Ansatzes und nach Verdünnung mit 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 oder 0,1ml Boratpuffer, pH 10 löste sich der gelbe Niederschlag nur teilweise auf. Eine mikroskopische Untersuchung des Niederschlages in B. III.2.1. - 2.4. ergab neben Kristallstrukturen auch den Nachweis gelber,



Abb. B.X.2.: Prozentuale Bindung der C-Peptidantikörper an den Tracer nach viermaliger Injektion von humanem C-Peptid mit einer Gesamtwenge von 0,66 mg C-Peptid/Kaninchen Serumverdünnung 1 : 100

amorpher Substanzen, die als Proteinstrukturen gedeutet wurden.

Die radiochemischen, gelchromatographischen und photometrischen Untersuchungen in B. III.3.1. - 3.5. sowie in B. III.4.1. - 4.6.4. ergaben, daß nur ein geringer Anteil des Peptids sich gelöst hatte. Untersuchungen mit **Glycin** ergaben, daß bereits das 1-Insuliny-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol nur schlecht löslich war und es bereits hier zu Quervernetzungen der einzelnen Moleküle untereinander gekommen sein mußte.

Dennoch wurde zunächst nur der lösliche Anteil des entstandenen Insulinderivates neun Meerschweinchen nach Homogenisierung mit Freundschem Adjuvant zweimal im vierzehntägigen Abstand injiziert. Als es dabei zu keinerlei Antikörperbildung kam, wurde nun zusätzlich auch der unlösliche Anteil des Insulinderivates den gleichen Meerschweinchen injiziert. Dabei kam es zu einer geringen Antikörperbildung, bei der nach der dritten Immunisierung das Serum von Tier Nummer 3 bei einer Serumverdünnung von 1:100 40,2% des Tracers binden konnte.

In B. VI.3.4.2. wurde porcines C-Peptid zunächst in gleicher Weise wie das porcine Insulin mit 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol aktiviert und anschließend in B. VI.3.5.3. an Rinderalbumin gekoppelt. Das dabei mit Albuminlösung versetzte gelbe 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzol löste sich jedoch im Gegensatz zu dem im Modellversuch verwendeten porcinen Insulin spontan auf und blieb auch nach 24stündiger Reaktionszeit gelöst.

Eine mikroskopische Untersuchung des geringen, weißlichen Niederschlages in B. VII.2.1. - 2.3. ergab bei bis zu 320facher Vergrößerung nur kristalline Strukturen; es handelte sich dabei lediglich um ausgefallene Boratkristalle. Die sukzessiven gelchromatographischen, photometrischen und radiochemischen Untersuchungen des gelösten Syntheseproduktes in B. VII.3.1. - 3.5.2. ergaben, daß über 80% ($89,4 \pm 8,8\%$) des 1-C-Peptidyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols sich mit dem Rinderalbumin zu 1-C-Peptidyl-5-Al-

buminyl-2,4-Dinitrobenzol umgesetzt hatten. Wie Untersuchungen des bei der Ätherextraktion verwendeten Diäthyläthers in B. VII. 3.6.1. - 3.6.3. ergaben, lagen die potentiellen Verluste an porcinem C-Peptid unter 5,6%.

Nach erfolgreicher Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols unter Verwendung von porcinem C-Peptid wurde in B. VIII.2.4.2. - 2.5.3. die Synthese mit dem humanen C-Peptid nachvollzogen. Es ergab sich kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich der Reaktionskinetik zur Synthese mit dem porcinen C-Peptid; das synthetisierte 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol unter Verwendung von humanem C-Peptid war ebenfalls auch nach 24stündiger Reaktionszeit vollständig gelöst.

Da nur insgesamt 4mg humanes C-Peptid zur Verfügung standen, wurde hinsichtlich der Produktanalyse ein Analogieschluß vom porcinen auf das humane C-Peptid gezogen, sodaß die gesamte Menge an humanem C-Peptid für die Immunisierung der sechs Kaninchen verwendet werden konnte. Hinsichtlich des chemischen Aufbaus ergeben sich zwischen porcinem und humanem 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol nur geringfügige Unterschiede (vergleiche dazu Abb. B. VI.1., Abb. B. VI.2. und Abb. B. VIII. 1.); das unterschiedliche immunologische Verhalten, das eng mit der exakten Aminosäuresequenz im Bereich der Antigen determinanten korreliert, bleibt davon unberührt.

Jeweils 2mg 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol (1mg humanes C-Peptid und 1mg Rinderalbumin) wurden in 0,9%iger Natriumchloridlösung und in Freund'schem Adjuvant zu gleichen Teilen gelöst, emulgiert und auf sechs Kaninchen verteilt injiziert. Drei weitere Boosterungen mit gleicher Antigenmenge erfolgten im vierzehntägigen Abstand. Nach 6 Wochen war eine Antikörperbildung radioimmunologisch nachweisbar. Das Serum von Tier Nummer 2 band dabei 5,4% des Tracers bei einer Serumverdünnung von 1:100. Eine Woche nach der 4. Immunisierung mit 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzol wurden die Kaninchen, da eine

weitere Immunisierung wegen Antigenmangels ausgeschlossen war, getötet und die durch Zentrifugation gewonnenen Seren radioimmunologisch auf ihre Antikörpertiter hin untersucht.

Der Antikörpertiter des Tieres Nummer 2 war inzwischen hinsichtlich der Bindung des Serums an den Tracer bei einer Verdünnung von 1:100 auf einen Wert von 18,9% angestiegen (vergleiche dazu Tab. B. X.1. und Tab. B. X.2.).

Auch bei den Übrigen, immunisierten Kaninchen war es zu einer Antikörperbildung gegen humanes C-Peptid gekommen. Die Antikörpertiter lagen jedoch hier noch niedriger als bei Tier Nr. 2.

9. XII. Diskussion

Untersuchungen zur Kopplung von porcinen Insulin als Modellsubstanz an Rinderalbumin mit der Difluoro-Dinitrobenzol-Methode nach Tager (Lit.39) ergaben, daß dieses Hapten ohne entscheidende Abwandlung der Methode hierfür nicht geeignet ist. Wie aus S. II.2.6. hervorgeht, kann 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol neben der erwünschten Bindung an die nicht-protonierte, freie N^α-terminale Aminosäure des Insulins auch chemische Bindungen mit den fünf Tyrosin- und den zwei Lysinmolekülen des Insulins eingehen. Es erscheint daher aufgrund der in B. III.3.1. - 4.6.4. durchgeführten physikalisch-chemischen Untersuchungen wahrscheinlich, daß bereits auf der Stufe des 1-Insulinylnyl-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols die einzelnen aktivierten Moleküle des Insulins zusätzlich untereinander reagieren und zu größeren Insulinkomplexen zusammentreten, die anschließend bei der Kopplung an das Rinderalbumin als schwer lösliche Peptidaggregation in Form des gelben Niederschlages auftreten.

Es ist daher als Nebenbefund dieser Arbeit zu vermuten, daß Peptide, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz mehrfach mit dem 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzol reagieren können, unter näher zu

klärenden Umständen für die Difluoro-Dinitrobenzol-Methode nach Tager (Lit.39) ungeeignet sind.

Die Synthese des 1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols ließ sich jedoch beim porcinen und beim humanen C-Peptid ohne Schwierigkeiten durchführen. Entscheidend hierfür dürfte die Tatsache sein, daß wegen ihrer Aminosäuresequenzen porcines und humanes C-Peptid nur mit der jeweils nicht-protonierten, freien N^α-terminalen Aminosäure reagieren können.

Der Bindungsanteil des porcinen C-Peptids lag bei einem C-Peptid/Albuminquotienten von 1 bei über 80% und konnte auch durch Verlängerung der Reaktionszeit auf 48 Stunden nicht noch weiter erhöht werden.

Der nach viermaliger Injektion von 0,166mg humanen C-Peptid/Kaninchen/Injektion im vierzehntägigen Abstand bei den sechs Kaninchen erzielte Antikörpertiter reicht noch nicht zur Verwendung der Seren in einem Radioimmunoassay aus. Dennoch sollte man dabei beachten, daß auch Heding(1974) zunächst mit geringerer zur Verfügung stehender Antigenmenge nur 52% Bindung ihrer Antikörper an den Tracer bei einer Serumverdünnung von 1:100 erzielt hatte, ehe sie bei etwas höheren, ihr zur Verfügung stehenden Antigenmengen einen akzeptablen Antikörpertiter von 1:3000 (Bindung an den Tracer: 66 - 72 %) erreichen konnte (Lit.33,34).

Es bleibt daher weiteren Untersuchungen mit etwas größeren Antigenmengen vorbehalten, herauszufinden, ob häufigere Boosterungen, ein auf eventuell 3 Wochen verlängertes Injektionsintervall und die Verwendung von Ziegen, wie dies bei Beischer (Lit.35) beschrieben ist, nicht auch mit dieser Methode zu einem beachtlichen Antikörpertiter gegen humanes C-Peptid führen können.

Da es beim humanen C-Peptid unter Verwendung der Difluoro-Dinitrobenzol-Methode nach Tager (Lit.39) zu keinerlei Synthese-

schwierigkeiten kommt und der am porcinen C-Peptid ermittelte Bindungsanteil über 80% liegt, erscheint eine erneute Tierversuchsserie bei noch etwas größeren, zur Verfügung stehenden Antigenmengen durchaus erfolgversprechend. Entscheidend hierfür ist vor allem auch die Tatsache, daß es aufgrund der Reaktionsmöglichkeiten des 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzols (Lit.40-43) bei der Anwendung der Difluoro-Dinitrobenzol-Methode nach Tager nicht zu einer Blockierung des nach Yanaihara (Lit.13) besonders entscheidenden Antigenlocus in Position 41 bis 43 des Human-Pro-insulin-C-Peptids kommt.

2. XIII. Tabellarischer Anhang

Tab. A. II.1.: Sisherige Untersuchungen zur Gewinnung von
Antikörpern gegen humanes C-Peptid

	<u>Melani(1970)</u> <u>Lit. 15</u>	<u>Kaneko(1974)</u> <u>Lit. 32</u>
verwendetes Antigen	humanes C-Peptid	synthetisiertes humanes C-Peptid
Trägermolekül	Kaninchenalbumin	keine Angabe
Hapten/Trägermolekül	3mg/1,5mg	keine Angabe
Kopplungsmethode	Carbodiimid (400mg/ml)	keine Angabe
Konjugat/ Freundsches Adjuvant	Derivat gelöst in 1ml 0,9% NaCl-Lösung/ 3ml Freundschem Adj.	Derivat gelöst in 1ml 0,9% NaCl-Lösung/ 1ml Freundschem Adj.
C-Peptid(gesamt)	2,5mg	keine Angabe
C-Peptid/Tier/Injekt.	0,35mg	1mg/ml
C-Peptid/Tier(gesamt)	1,05mg/1,4mg	keine Angabe
Versuchstiere(gesamt)	2 Meerschweinchen	Kaninchen
Versuchstiere mit An- tikörpern nach Immunis.	2 Meerschweinchen	keine Angabe
Boosterungen	3mal/4mal	mehrere
Intervall	alle 2-3 Wochen	alle 2-3 Wochen
Entblutung	10 Tage nach der letzten Injektion	10 Tage nach der letzten Injektion
erzielter Antikörper- titer	max. 1:1000	max. 1:7000
Bindung an den Tracer	>50%	>90%
Nachweisgrenze	0,05-0,1mg/ml	0,1mg/ml

Tab. A.II.1.: Sisherige Untersuchungen zur Gewinnung von Antikörpern gegen humanes C-Peptid

	<u>Heding(1974)</u> <u>Lit. 33</u>	<u>Heding(1975)</u> <u>Lit. 34</u>
verwendetes Antigen	humane b-Komponente	humane b-Komponente
Trägermolekül	kein verwendetes Trägermolekül	kein verwendetes Trägermolekül
Hapten/Trägermolekül		
Kopplungsmethode	nicht erforderlich	nicht erforderlich
Konjugat/ Freundsches Adjuvant	1:1(2mg/ml)	1:1(2mg/ml)
C-Peptid(gesamt)	keine Angabe	keine Angabe
C-Peptid/Tier/Injekt.	1mg	2mg/ml
C-Peptid/Tier(gesamt)	keine Angabe	keine Angabe
Versuchstiere(gesamt)	Meerschweinchen	12 Meerschweinchen
Versuchstiere mit induzierten Antikörpern	alle	9 Meerschweinchen
Boosterungen	mehrere (keine genauen Angaben)	8-9
Intervall	alle 3 Wochen	alle 3 Wochen
Entblutung	keine Angabe	keine Angabe
erzielter Antikörpertiter	max. 1:100	max. 1:3000
Bindung an den Tracer	max. 62%	66% - 72%
Nachweisgrenze	keine Angabe	0,07 pmol/ml

Tab. 4. II.1.: Bisherige Untersuchungen zur Gewinnung von
Antikörpern gegen humanes C-Peptid

	<u>Geischer (1976)</u> <u>Lit. 35</u>	<u>Geischer (1976)</u> <u>Lit. 35</u>
verwendetes Antigen	humanes C-Peptid	humanes C-Peptid
Trägermolekül	Kaninchenalbumin	Kaninchenalbumin (jedoch nur für 1. und 2. Boosterung)
Hapten/Trägermolekül	10mg/ml bzw. 50mg/ml	
Kopplungsmethode	Carbodiimido (400mg/ml)	
Konjugat/ Freundsches Adjuvant	1:3	1:2 sowie 100mg Kohle
C-Peptid(gesamt)	50mg	
C-Peptid/Tier/Injekt.	1. Injektion: 1mg/kgKG Boosterungen: 0,25mg/kgKG	1. Injektion: 0,02mg/kgKG Boosterungen: 0,01mg/kgKG
C-Peptid/Tier(gesamt)	2,25mg/kgKG	0,1mg/kgKG
Versuchstiere(gesamt)	10 Meerschweinchen	2 Ziegen
Versuchstiere mit in- duzierten Antikörpern	4 Meerschweinchen	1 Ziege
Boosterungen	6	9
Intervall	4-6 Wochen	4-6 Wochen
Entblutung	keine Angabe	keine Angabe
erzielter Antikörper- titer	geringer Titer (keine genaue Angabe)	max. 1:150 000
Bindung an den Tracer	keine Angabe	>90%
Nachweisgrenze	keine Angabe	0,05ng/Ansatz

Tab. 3. II.1.: Bisherige Untersuchungen zur Gewinnung von
Antikörpern gegen humanes C-Peptid

	<u>Fader(1975)</u>
	<u>Lit. 36</u>
verwendetes Antigen	benzyloxycarbonyliertes C-Peptid(N-terminal)
Trägermolekül	humanes Albumin
Hapten/Trägermolekül	23:1; 15:1; 4:1
Kopplungsmethode	Carbodiimid(500mg)
Konjugat/ Freundsches Adjuvant	1:2
C-Peptid(gesamt)	200mg
C-Peptid/Tier/Injekt.	0,1mg/0,2mg
C-Peptid/Tier(gesamt)	0,8mg/1,6mg
Versuchstiere(gesamt)	30 Meerschweinchen
Versuchstiere mit Anti- körpern nach Immunis.	25 Meerschweinchen
Boosterungen	8
Intervall	3-4 Wochen
Entblutung	keine Angabe
erzielter Antikörper- titer	max. 1:20 000
Bindung an den Tracer	>50%
Nachweisgrenze	0,10 pmol/ml

Tab. A. II.2.: Radioimmunologische Bestimmungsverfahren für
des humane C-Peptid

1. Verwendetes Antiserum

- Melani(1970), Lit.15: gegen mit der Carbodiimid-Methode an
Albumin gekoppeltes humanes C-Peptid
- Kaneko(1974), Lit.32: gegen synthetisches humanes C-Peptid
- Heding(1974), Lit.33: gegen humane b-Komponente
- Heding(1975), Lit.34: gegen humane b-Komponente
- Beischer(1976), Lit.35: gegen mit der Carbodiimid-Methode an
Albumin gekoppeltes humanes C-Peptid
- Faber(1976), Lit.36: gegen mit der Carbodiimid-Methode an
Albumin gekoppeltes, synthetisiertes
benzyloxycarbonyliertes C-Peptid
- Heding(1977), Lit.37: gegen humanes C-Peptid
- Rainbow(1979), Lit.38: gegen humanes C-Peptid

2. Verwendeter Tracer

- Melani(1970), Lit.15: synthetisiertes $^{131}\text{-J-Tyr-C-Peptid}$ nach
der Methode von Hunter und Greenwood
(1962), gelchromatographisch gereinigt
über Bio-Gel P 30 in 3 M Essigsäure
- Kaneko(1974), Lit.32: synthetisiertes $^{125}\text{-J-Tyr-C-Peptid}$ nach
Greenwood et al. (1963), gereinigt nach
Melani(1970) s.o.
- Heding(1974), Lit.33: mit tBOC Tyr-p-nitrophenylester in Di-
methylformamid reagiertes C-Peptid,
Jodination nach Markussen et al. (1970),
Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie über QAE-Sephadex A 25
- Heding(1975), Lit.34: synthetisiertes $^{125}\text{-J-Tyr-C-Peptid}$
nach Heding(1974) s.o.
- Beischer(1976), Lit.35: mit der Chloramin-T-Methode syntheti-
siertes $^{125}\text{-J-Tyr-C-Peptid}$

- Faber(1976), Lit.36: synthetisches 125-J-Tyr-C-Peptid
Heding(1977), Lit.37: synthetisches 125-J-Tyr-C-Peptid
Rainbow(1979), Lit.38: synthetisches 125-J-Tyr-C-Peptid

3. Trennmethode

- Melani(1970), Lit.15: Doppelantikörpermethode
Kaneko(1974), Lit.32: Doppelantikörpermethode
Heding(1974), Lit.33: Doppelantikörpermethode
Heding(1975), Lit.34: Doppelantikörpermethode
Beischer(1976), Lit.35: Doppelantikörpermethode
Faber(1976), Lit.36: Doppelantikörpermethode/Äthanol
Heding(1977), Lit.37: Doppelantikörpermethode
Rainbow(1979), Lit.38: Prinzip: Bindung des gegen den C-Peptidanteil des Proinsulins gerichteten IgG-Antikörpers vom Kaninchen durch einen 125-J-IgG-Antikörper vom Schaf

4. Verfahren

- Melani(1970), Lit.15: R I A
Kaneko(1974), Lit.32: R I A
Heding(1974), Lit.33: R I A
Heding(1975), Lit.34: R I A
Beischer(1976), Lit.35: R I A
Faber(1976), Lit.36: R I A
Heding(1977), Lit.37: direkter R I A
Rainbow(1979), Lit.38: indirekter, zweiseitiger immunoradiometrischer Assay

5. Sensitivität der Testverfahren

- Melani(1970), Lit.15: 0,05-0,1ng/ml
Kaneko(1974), Lit.32: 0,1ng/ml
Heding(1974), Lit.33: keine Angabe des Autors
Heding(1975), Lit.34: 0,0025pm/0,1ml
Beischer(1976), Lit.35: 0,05ng/Ansatz (gilt nur für das Antiziegenserum)

Faber(1976), Lit.36: 0,1pmol/ml
Heding(1977), Lit.37: 0,01pmol/ml
Rainbow(1978), Lit.38: 0,006pmol/ml

Tab. B. II.3.1.: Requerte der radiochemischen Untersuchung zur Bestimmung von Bindungsanteil und Löslichkeit des 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols in Imp./min sowie im prozentualen Anteil der eingesetzten Gesamtaktivität an 125-Jod-Insulin

	A	A-B	P
GA	54 028	53 990	100,0
VJ	3 352	3 014	5,6
AS1	731	693	1,3
AS2	255	217	0,4
AM1	436	398	0,7
AM2	51	13	0
AM3	33	0	0

Legende zu Tab. B. III.3.1.:

- A : gemessene Aktivität in γ -Scintillationszähler
A-B: gemessene Aktivität minus Background
P : prozentualer Anteil der gemessenen Aktivität an der Gesamtaktivität des 125-Jod-Insulins
GA : Gesamtaktivität an 125-Jod-Insulin
VJ : Verluste an 125-Jod-Insulin in PPM-Röhrchen und Pipettenansatzstück
AS1: Aktivität des in 0,1ml Boratpuffer löslichen 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols
AS2: Aktivität des in weiteren 0,1ml Boratpuffer löslichen 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols
AM1: Aktivität der ersten Ätherfraktion
AM2: Aktivität der zweiten Ätherfraktion
AM3: Aktivität der dritten Ätherfraktion
B : Background ± 25 Imp./min

Tab. B. III.4.1.: Ergebnisse der photometrischen Bestimmung des in Boratpuffer, pH 10 gelösten und gelchromatographisch gereinigten 1-Insuliny-1-5-Glyciny-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda=340\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,010
2	0,011	22	0,011
3	0,007	23	0,012
4	0,008	24	0,006
5	0,002	25	0,029
6	0,000	26	0,070
7	0,003	27	0,161
8	0,010	28	0,234
9	0,000	29	0,108
10	0,011	30	0,029
11	0,010	31	0,033
12	0,003	32	0,012
13	0,000	33	0,018
14	0,009	34	0,010
15	0,001	35	0,014
16	0,009	36	0,009
17	0,005	37	0,003
18	0,000	38	0,006
19	0,000	39	0,005
20	0,014	40	0,001

Tab. 9. III.4.2.: Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchung des nach 8. III.4.2.2. säulenchromatographisch gereinigten 1-Insuliny1-5-Glyciny1-2,4-Dinitrobenzols

λ (nm)	Extinktionen der Fraktion 27	Extinktionen der Fraktion 28
220	0,112	0,137
225	0,104	0,129
230	0,093	0,116
235	0,083	0,103
240	0,074	0,091
245	0,061	0,088
250	0,050	0,062
255	0,049	0,066
260	0,055	0,069
265	0,051	0,064
270	0,044	0,053
275	0,034	0,045
280	0,030	0,040
285	0,026	0,035
290	0,028	0,036
295	0,032	0,036
300	0,036	0,040
305	0,042	0,046
310	0,058	0,064
315	0,069	0,084
320	0,088	0,120
325	0,116	0,177
330	0,131	0,196
335	0,146	0,217
340	0,158	0,232
345	0,162	0,238
350	0,158	0,234
355	0,147	0,220
360	0,127	0,198
370	0,103	0,172
380	0,102	0,172
390	0,107	0,178
400	0,110	0,183
410	0,102	0,166
420	0,087	0,138
440	0,044	0,080
460	0,015	0,042
480	0,003	0,018
500	0,000	0,002

Tab. 3. III.4.3.: Meßwerte der photometrischen Bestimmung des
in 0,1ml 7 M Harnstofflösung, pH 3,4 (unge-
puffert) gelösten und gelchromatographisch
gereinigten 1-Insuliny1-5-Glyciny1-2,4-Dini-
trobenzols bei $\lambda=340\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,000
2	0,013	22	0,000
3	0,003	23	0,026
4	0,000	24	0,147
5	0,000	25	0,322
6	0,000	26	0,178
7	0,006	27	0,000
8	0,000	28	0,001
9	0,000	29	0,000
10	0,000	30	0,000
11	0,000	31	0,000
12	0,003	32	0,001
13	0,014	33	0,000
14	0,006	34	0,002
15	0,000	35	0,001
16	0,000	36	0,000
17	0,000	37	0,000
18	0,001	38	0,003
19	0,000	39	0,000
20	0,000	40	0,000

Tab. 9. III.4.4.: Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchung des nach 8. III.4.3.2. säulenchromatographisch gereinigten 1-Insulinylnyl-5-Glycinylnyl-2,4-Dinitrobenzols

λ (nm)	Extinktionen der Fraktion 13	Extinktionen der Fraktion 25
220	0,036	0,279
225	0,025	0,242
230	0,010	0,214
235	0,000	0,192
240	0,000	0,163
245	0,000	0,134
250	0,000	0,120
255	0,000	0,133
260	0,000	0,136
265	0,000	0,127
270	0,000	0,110
275	0,000	0,090
280	0,000	0,079
285	0,000	0,072
290	0,000	0,072
295	0,000	0,075
300	0,001	0,084
305	0,000	0,082
310	0,005	0,127
315	0,010	0,157
320	0,011	0,191
325	0,005	0,208
330	0,006	0,250
335	0,007	0,287
340	0,012	0,322
345	0,011	0,339
350	0,007	0,330
355	0,005	0,305
360	0,000	0,270
365	0,000	0,235
370	0,000	0,218
380	0,000	0,217
390	0,000	0,238
400	0,000	0,243
410	0,000	0,223
420	0,000	0,177
430	0,000	0,123
440	0,000	0,067
450	0,000	0,021
460	0,000	0,003
480	0,000	0,000
500	0,000	0,000

Tab. 8. III.4.5.: Ergebnisse der photometrischen Bestimmung des
in insgesamt 0,2ml(!) 7 M Harnstofflösung,
pH 8,4 (ungepuffert) gelösten und gelochroma-
tographisch gereinigten 1-Insuliny1-5-Glyci-
ny1-2,4-Dinitrobenzols bei $\lambda=340\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,000
2	0,000	22	0,000
3	0,000	23	0,000
4	0,000	24	0,030
5	0,000	25	0,168
6	0,003	26	0,375
7	0,000	27	0,200
8	0,005	28	0,028
9	0,006	29	0,000
10	0,004	30	0,001
11	0,018	31	0,000
12	0,037	32	0,002
13	0,086	33	0,000
14	0,295	34	0,000
15	0,213	35	0,002
16	0,048	36	0,001
17	0,015	37	0,001
18	0,008	38	0,000
19	0,000	39	0,000
20	0,000	40	0,000

Tab. 8. III.4.6.: Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchung des nach 8. III. 4.4.2. säulenchromatographisch gereinigten 1-Insuliny1-5-Glyciny1-2,4-Dinitrobenzols

λ (nm)	Extinktionen der Fraktion 14	Extinktionen der Fraktion 26
220	0,720	0,300
225	0,600	0,255
230	0,452	0,219
235	0,350	0,191
240	0,291	0,174
245	0,267	0,158
250	0,226	0,150
255	0,200	0,143
260	0,177	0,138
265	0,169	0,117
270	0,160	0,082
275	0,152	0,056
280	0,150	0,044
285	0,151	0,044
290	0,156	0,050
295	0,161	0,063
300	0,172	0,075
305	0,187	0,096
310	0,205	0,119
315	0,225	0,160
320	0,242	0,210
325	0,258	0,259
330	0,275	0,310
335	0,290	0,350
340	0,300	0,377
345	0,311	0,400
347	0,309	0,413
350	0,305	0,402
355	0,297	0,379
360	0,270	0,356
365	0,242	0,337
370	0,224	0,320
375	0,203	0,307
380	0,190	0,319
390	0,181	0,340
400	0,173	0,330
410	0,161	0,290
420	0,150	0,234
430	0,134	0,150
440	0,120	0,078
460	0,082	0,025
480	0,034	0,007
500	0,002	0,000

Tab. 9. III.4.7.: Ergebnisse der photometrischen Bestimmung des in 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 löslichen Anteils des an Rinderalbumin gekoppelten 1-Insuliny1-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols nach gelchromatographischer Separation über Sephadex G-50 bei $\lambda=340\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,003
2	0,004	22	0,001
3	0,001	23	0,007
4	0,001	24	0,002
5	0,005	25	0,000
6	0,000	26	0,000
7	0,001	27	0,000
8	0,004	28	0,000
9	0,000	29	0,001
10	0,000	30	0,000
11	0,030	31	0,008
12	0,246	32	0,000
13	0,567	33	0,024
14	0,137	34	0,046
15	0,025	35	0,047
16	0,015	36	0,068
17	0,010	37	0,059
18	0,000	38	0,027
19	0,010	39	0,007
20	0,000	40	0,000

Tab. 8. III.4.8.: Ergebnisse der photometrischen Untersuchung des in 0,1ml Guanidin-Phosphatpuffer, pH 7,2 löslichen Anteils des an Rinderalbumin gekoppelten 1-Insulinyll-5-Fluoro-2,4-Dinitrobenzols nach gelchromatographischer Separation über Sephadex G-50 bei $\lambda=276\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,004
2	0,002	22	0,003
3	0,001	23	0,000
4	0,000	24	0,000
5	0,001	25	0,005
6	0,000	26	0,000
7	0,003	27	0,000
8	0,002	28	0,000
9	0,000	29	0,000
10	0,000	30	0,000
11	0,064	31	0,001
12	0,075	32	0,000
13	0,026	33	0,002
14	0,014	34	0,000
15	0,002	35	0,000
16	0,001	36	0,003
17	0,001	37	0,000
18	0,003	38	0,000
19	0,002	39	0,000
20	0,000	40	0,000

Tab. 9. III.4.9.: Ergebnis der photometrischen Bestimmung von
1mg Rinderalbumin über Sephadex G-50 bei
 $\lambda=276\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,002	21	0,000
2	0,001	22	0,008
3	0,011	23	0,002
4	0,003	24	0,000
5	0,001	25	0,001
6	0,000	26	0,001
7	0,002	27	0,002
8	0,005	28	0,001
9	0,000	29	0,000
10	0,063	30	0,000
11	0,141	31	0,000
12	0,025	32	0,000
13	0,009	33	0,000
14	0,007	34	0,000
15	0,000	35	0,000
16	0,000	36	0,001
17	0,001	37	0,000
18	0,003	38	0,000
19	0,002	39	0,000
20	0,000	40	0,000

Tab. 9. III.4.10.: Ergebnisse der spektralphotometrischen Untersuchung des nach 3. III.4.6.3. gel-chromatographisch gereinigten Rinder-albumins

λ (nm)	Extinktion der Fraktion 11
220	1,430
225	1,350
230	0,980
235	0,436
240	0,186
245	0,103
250	0,084
255	0,090
260	0,099
265	0,110
270	0,123
275	0,139
276	0,142
290	0,132
285	0,110
290	0,081
295	0,046
300	0,032
305	0,022
310	0,028
315	0,024
320	0,020
325	0,025
330	0,021
335	0,013
340	0,003
345	0,001
350	0,000
355	0,009
360	0,012
370	0,013
380	0,000
400	0,004
420	0,000
440	0,000
460	0,000
480	0,000
500	0,000

Tab. 8. V.1.: Bestimmung der Insulinantikörper mittels Radio-
immunoassay nach einer Versuchsdauer von 4 Wochen
bei einer Serumverdünnung von 1:100

TA 5263 CPM
3 859 $\pm$ 50 CPM
TA-8 4404 $\pm$ 50 CPM

Meerschweinchen	CPM _i	CPM _{i-3}	P
1	869	10 $\pm$ 50	$\emptyset$
2	890	31 $\pm$ 50	$\emptyset$
3	895	36 $\pm$ 50	$\emptyset$
4	874	15 $\pm$ 50	$\emptyset$
5	870	11 $\pm$ 50	$\emptyset$
6	872	13 $\pm$ 50	$\emptyset$
7	866	7 $\pm$ 50	$\emptyset$
8	899	40 $\pm$ 50	$\emptyset$
9	893	34 $\pm$ 50	$\emptyset$
10	825	-34 $\pm$ 50	$\emptyset$

Tab. 8. V.2.: Bestimmung der Insulinantikörper mittels Radio-
immunoassay nach einer Versuchsdauer von 6 Wochen
bei einer Serumverdünnung von 1:100

TA 10526 CPM
3 2039 $\pm$ 110 CPM
TA-8 8487 $\pm$ 110 CPM

Meerschweinchen	CPM _i	CPM _{i-8}	P
1	2101	63 $\pm$ 110	$\emptyset$
2	2218	177 $\pm$ 110	2,1
3	2189	150 $\pm$ 110	1,8
4	1998	-41 $\pm$ 110	$\emptyset$
5	1950	-89 $\pm$ 110	$\emptyset$
6	1956	-83 $\pm$ 110	$\emptyset$
7	2063	24 $\pm$ 110	$\emptyset$
8	2090	51 $\pm$ 110	$\emptyset$
9	2074	35 $\pm$ 110	$\emptyset$
10	2086	47 $\pm$ 110	$\emptyset$

Tab. 8. V.3.: Bestimmung der Insulinantikörper mittels Radio-immunoassay nach einer Versuchsdauer von 8 Wochen bei einer Serumverdünnung von 1:100

TA	11 538	CPM
B	626 $\pm$ 40	CPM
TA-B	10 910 $\pm$ 40	CPM

Meerschweinchen	CPM _i	CPM _i -B	P
1	650	22 $\pm$ 40	Ø
2	1830	1202 $\pm$ 40	11
3	5017	4388 $\pm$ 40	40,2
4	2973	2345 $\pm$ 40	21,5
5	1607	979 $\pm$ 40	9
6	etwa 6 Wochen nach Versuchsbeginn verstorben (siehe B. IV.6.)		
7	2263	1635 $\pm$ 40	13
8	717	89 $\pm$ 40	0,8
9	652	24 $\pm$ 40	Ø
10	657	29 $\pm$ 40	Ø

Legende für Tabelle 8. V.1. - V.3.:

- TA $\hat{=}$ Aktivität des Testansatzes
- B $\hat{=}$ Background
- TA-B $\hat{=}$ Differenz zwischen der Aktivität des Testansatzes und der des Backgrounds
- CPM $\hat{=}$ Impulse pro Minute (counts per minute)
- CPM_i $\hat{=}$ in den Serumsproben gemessene Impulse pro Minute
- CPM_i-B $\hat{=}$ Differenz zwischen der Aktivität der Serumsprobe und der des Backgrounds
- P $\hat{=}$ Bindungsanteil des Tracers an Insulinantikörper in Prozent

Tab. B. VII.1.: Photometrie des gelchromatographisch gereinigten
1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols
bei $\lambda=340\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,068
2	0,012	22	0,051
3	0,011	23	0,050
4	0,010	24	0,052
5	0,015	25	0,041
6	0,007	26	0,034
7	0,013	27	0,043
8	0,013	28	0,210
9	0,012	29	0,302
10	0,530	30	0,282
11	0,945	31	0,034
12	0,162	32	0,035
13	0,094	33	0,026
14	0,117	34	0,031
15	0,113	35	0,025
16	0,140	36	0,014
17	0,171	37	0,015
18	0,130	38	0,009
19	0,112	39	0,003
20	0,079	40	0,001

Tab. B. VII.2.: Photometrie des gelchromatographisch gereinigten
1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols
bei $\lambda=276\text{nm}$

Fraktion	Extinktion	Fraktion	Extinktion
1	0,000	21	0,000
2	0,009	22	0,005
3	0,001	23	0,000
4	0,003	24	0,000
5	0,006	25	0,000
6	0,009	26	0,000
7	0,010	27	0,000
8	0,001	28	0,017
9	0,005	29	0,000
10	0,247	30	0,010
11	0,560	31	0,012
12	0,220	32	0,010
13	0,023	33	0,009
14	0,031	34	0,008
15	0,021	35	0,005
16	0,067	36	0,000
17	0,098	37	0,000
18	0,049	38	0,002
19	0,021	39	0,001
20	0,011	40	0,000

Tab. 8. VII.3.: Spektrum des gelchromatographisch gereinigten
1-C-Peptidyl-5-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols
(Reaktionszeit: 24 Stunden)

λ (nm)	Fraktion 11	Fraktion 28
220	2,000	0,255
225	2,200	0,242
230	1,600	0,222
235	1,000	0,195
240	0,680	0,146
245	0,540	0,105
250	0,475	0,094
255	0,430	0,090
260	0,420	0,110
265	0,445	0,095
270	0,475	0,070
275	0,536	0,039
276	0,560	0,037
280	0,540	0,004
285	0,530	0,000
290	0,510	0,000
295	0,500	0,000
300	0,535	0,001
305	0,595	0,003
310	0,690	0,015
315	0,760	0,052
320	0,840	0,097
325 ¹	0,900	0,125
330	0,952	0,191
335	0,980	0,230
340	1,000	0,232
345	0,975	0,277
350	0,950	0,266
355	0,860	0,250
360	0,700	0,241
370	0,505	0,230
380	0,490	0,222
385 ²	0,480	0,240
400	0,480	0,221
410	0,510	0,160
420	0,530	0,095
440	0,450	0,013
460	0,248	0,004
480	0,085	0,000
500	0,000	0,000

1: Umstellung des Photometers auf sichtbares Licht, Benutzung
eines Filters für den Wellenlängenbereich von 325nm λ < 380nm

2: Benutzung eines Filters für den Wellenlängenbereich
von 385nm λ < 500nm

Tab. 3. VII.4.: Gemessene Aktivitäten der nach 3. VII.3.2.2. gewonnenen Fraktionen 1 bis 40 des über Sephadex G-50 gelchromatographisch gereinigten und mit 125-Jod-C-Peptid markierten 1-C-Peptidyl-S-Albuminyl-2,4-Dinitrobenzols

F	A	A-B	CA
1	42	6 $\pm$ 15	7
2	31	-5 $\pm$ 15	7
3	34	-2 $\pm$ 15	7
4	31	-5 $\pm$ 15	7
5	28	-8 $\pm$ 15	7
6	38	2 $\pm$ 15	7
7	38	2 $\pm$ 15	7
8	35	-1 $\pm$ 15	7
9	30	-6 $\pm$ 15	7
10	458	422 $\pm$ 15	+++
11	787	751 $\pm$ 15	+++
12	126	90 $\pm$ 15	+
13	54	18 $\pm$ 15	(+)
14	53	17 $\pm$ 15	(+)
15	57	21 $\pm$ 15	(+)
16	68	32 $\pm$ 15	(+)
17	53	17 $\pm$ 15	(+)
18	42	6 $\pm$ 15	7
19	43	7 $\pm$ 15	7
20	41	5 $\pm$ 15	7
21	35	-1 $\pm$ 15	7
22	47	11 $\pm$ 15	7
23	39	3 $\pm$ 15	7
24	40	4 $\pm$ 15	7
25	37	1 $\pm$ 15	7
26	41	5 $\pm$ 15	7
27	44	8 $\pm$ 15	7
28	93	57 $\pm$ 15	+
29	111	75 $\pm$ 15	(+)
30	66	30 $\pm$ 15	(+)
31	38	2 $\pm$ 15	7
32	49	13 $\pm$ 15	7
33	38	2 $\pm$ 15	7
34	38	2 $\pm$ 15	7
35	29	-7 $\pm$ 15	7
36	36	-0 $\pm$ 15	7
37	33	-3 $\pm$ 15	7
38	33	-3 $\pm$ 15	7
39	33	-3 $\pm$ 15	7
40	38	2 $\pm$ 15	7

Der aus 100 Messungen errechnete Background lag bei 36 $\pm$ 15 Imp./min. Der höchste diesbezügliche Meßwert lag bei 51 Imp./min.

Legende zu Tab. 3. VII.4.:

- F = Fraktionsnummer
- A = gemessene Aktivität in Imp./min.
- B = Background
- A-B = gemessene Aktivität minus Background
- CA = durch 125-Jod-C-Peptid hervorgerufene Radioaktivität
(Gammastrahlung!)
- Z = nur Background-Radioaktivität
- (+) = Spuren von 125-Jod-C-Peptid
- +
- +++ = hoher Gehalt an 125-Jod-C-Peptid

Tab. 8. VII.5.: Anteil des 125-Jod-C-Peptids an Ausschluß- und Retentionsvolumen in Prozent

	SU	P
AV	1368 $\pm$ 120	89,4 $\pm$ 3,9
RV	162 $\pm$ 45	10,6 $\pm$ 3,6
GS	1530 $\pm$ 165	100,0 $\pm$ 12,4

Legende:

SU = Summe der gemessenen Aktivitäten in Imp./min
P = prozentualer Anteil des 125-Jod-C-Peptids
AV = Ausschlußvolumen (Fraktion 10 bis 17)
RV = Retentionsvolumen (Fraktion 28 bis 30)
GS = Gesamtsumme der gemessenen Aktivitäten in Imp./min

Tab. 8. VII.6.: Gemessene Aktivitäten des Diäthyläthers

EF	A	A-B	CA
1.	131	91 $\pm$ 20	+
2.	45	5 $\pm$ 20	Ø
3.	56	16 $\pm$ 20	Ø

Background: 40 $\pm$ 20 Imp./min

Legende:

EF = Diäthyläther der jeweiligen Extraktion
A = gemessene Radioaktivität des Diäthyläthers in Imp./min
A-B = gemessene Aktivität minus Background
CA = durch 125-C-Peptid hervorgerufene Radioaktivität
Ø = nur Background-Aktivität

Tab. B. X.1.: Bestimmung der C-Peptidantikörper nach einer Versuchsdauer von 6 Wochen über die in einem γ -Szintillationszähler nach dem in B. X.1.3. durchgeführten R I A gemessenen Impulse pro Minute bei einer Verdünnung der Seren mit C-Peptidpuffer von 1:100

TA 11320 CPM
B 1340 ± 15 CPM
TA-B 9980 ± 15 CPM

Tier	CPM _i	CPM _i -B	P
1	1491	151 ± 15	1,5
2	1884	545 ± 15	5,4
3	1777	437 ± 15	4,4
4	2066	725 ± 15	7,3
5	1516	176 ± 15	1,8
6	1520	190 ± 15	1,8

Tab. B. X.2.: Bestimmung der C-Peptidantikörper nach einer Versuchsdauer von 8 Wochen über die in einem γ -Szintillationszähler nach dem in B. X.1.3. durchgeführten R I A gemessenen Impulse pro Minute bei einer Verdünnung der Seren mit C-Peptidpuffer von 1:100

TA 11320 CPM
B 1340 ± 15 CPM
TA-B 9980 ± 15 CPM

Tier	CPM _i	CPM _i -B	P
1	1709	369 ± 15	3,7
2	3226	1886 ± 15	18,9
3	2615	1275 ± 15	12,8
4	2244	904 ± 15	9,1
5	1976	636 ± 15	6,4
6	1614	274 ± 15	2,7

B. XIV. Literaturregister(Lit.)

1. Markussen, J., Heding, L.G., Jørgensen, K.H.: Proinsulin, insulin and C-peptide. Horm.Metab.Res.Suppl., 3, 34(1971)
2. Tager, H.S.: High Titer Glucagon Antisera. Endocrinol., 100(2), 367-372(1977)
3. Kemmler, W., Peterson, J.D., Rubenstein, A.H.: On the Biosynthesis, Intracellular Transport and Mechanism of Conversion of Proinsulin to Insulin and C-Peptide. Diabetes 21(Suppl.2), 572-581(1972)
4. Malaisse-Lagae, F., Amherdt, M., Ravazzola, M.: Role of Microtubules in the Synthesis, Conversion, and Release of (Pro)insulin. J.Clin.Invest., 63, 1284-1296(1979)
5. Beischer, W., Heinze, E., Keller, L.: Human C-Peptide, clinical studies. Klin.Wschr. 54, 723 (1976)
6. Faber, Ole K., Kehlet, H., Madsbad, S.: Kinetics of Human C-peptide in Man. Diabetes 27(Suppl.1), 207-209(1978)
7. Clark, J.I., Cho, S., Rubenstein, A.H.: Isolation of a proinsulin C-peptide fragment from bovine and human pancreas. Biochem.Biophys.Res.Comm. 35, 456-460(1969)
8. Geiger, R., Jäger, G., König, W.: Synthesepfad und Darstellung der Sequenz 28-31 des Human-Proinsulin-C-Peptids, Chem.Ber. 106, 188-192(1973)
9. Geiger, R., Volk, A.: Darstellung der Sequenzen 14-17 und 9-13 des Human-Proinsulin-C-Peptids, Chem.Ber. 106, 199-205(1973)
10. König, W.: Darstellung der Sequenzen 18-23 und 24-27 des Human-Proinsulin-C-Peptids, Chem.Ber. 106, 193-198(1973)
11. Jäger, G.: Darstellung der Sequenzen 1-8 des Human-Proinsulin-C-Peptids, Chem.Ber. 106, 206-210(1973)
12. Naithani, V.K.: Studies on polypeptides, IV. The synthesis of C-peptide of human proinsulin. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354(6), 659-672(1973)

13. Yanaihara, N., Hashimoto, T., Yanaihara, C.: Synthesis of human connecting peptide derivatives and their immunological properties. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 59, 1124-1130(1974)
14. Block, M.D., Mako, M., Steiner, D.F.: Circulation C-Peptide immunoreactivity. Studies in normal and diabetic patients, *Diabetes* 21, 1013(1972)
15. Melani, F., Rubenstein, A.H., Oyer, P.E.: Identification of proinsulin and C-peptide in human serum by a specific immunoassay. *Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.)* 67, 148-155(1970)
16. Krause, U., Beyer, J., Cordes, U.: Serum-C-Peptid - ein neuer Parameter in der Diabetesdiagnostik. *Lab.med.* 2, 43-46(1978)
17. Krause, U., Cordes, U., Beyer, J.: Serum-C-Peptidspiegel und Seruminsulin bei Patienten mit Hypoglycämien sowie unterschiedlichen Über- und Unterfunktionszuständen des Inselsystems. *Diab.croat.* 5, 263-274(1976)
18. Pfeiffer, E.F., Raptis, S.: Controlled extension of oral antidiabetic therapy on former insulin dependent diabetics by means of combined i.v. glibenclamide-glucose response test. *Diabetologia* 8, 41(1972)
19. Gorden, P., Roth, J.: Plasma Insulin: Fluctuation in the "big" insulin component in man after glucose and other stimuli. *J.Clin.Invest.* 48, 2225-2234(1970)
20. Rubenstein, A.H., Block, M.B. Starr, J.: Proinsulin and C-Peptide in Blood. *Diabetes* 21 (Suppl.2), 661-672(1972)
21. Duckworth, W.G., Kitabchi, A.E.: The effect of age on plasma proinsulin-like material after oral glucose. *J.Lab. Clin. Med.* 88(3), 359-367(1976)
22. Gorden, P., Hendricks, C.M., Roth, J.: Circulating proinsulin-like component in man: increased proportion in hypoinsulinemic states. *Diabetologia* 10(5), 469-474(1974)
23. Kitabchi, A.E.: Proinsulin and C-peptide: a review. *Metabolism* 26(5), 547(1977)

24. Jaspan, J.B., Mako, M.E., Kuzuya, H.: Abnormalities in circulating beta cell peptides in chronic renal failure: comparison of C-peptide, proinsulin and insulin. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 45(3), 441-446(1977)
25. Heding, L.G.: Insulin, C-peptide, and proinsulin in non-diabetics and insulin-treated diabetics. Characterization of the proinsulin in insulin-treated diabetics. *Diabetes* 27(Suppl.1), 178-183(1978)
26. Fink, G., Cresto, J.G., Gutman, R.A.: Plasma proinsulin-like material in insulin-treated diabetics. *Horm.Metab. Res.* 6, 439-443(1974)
27. Kerp, L.: Quantitative Data Concerning the Localisation of Antibody Binding Sites on Insulin and Proinsulin Molecules. *Int.Arch.Allergy* 41, 216-218(1971)
28. Rubenstein, A.H., Porter, W., Mako, M.: Comparative Immunology of Bovine, Porcine and Human Proinsulins and C-peptides. *Diabetes* 19 (8), 546-552(1970)
29. Gerbitz, K.D.: Pankreatische B-Zellen-Peptide: Kinitik und Konzentration von Proinsulin, Insulin und C-Peptid in Plasma und Urin, Probleme der Meßmethoden, klinische Aussage und Literaturübersicht. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 18, 313-326 (1980)
30. Steiner, D.F., Hallund, O., Rubenstein, A.H.: Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms and other minor components from crystalline bovine insulin. *Diabetes* 17, 725(1968)
31. Caygill, C.P.J., Das, R.E.B., Bangham, D.R.: Use of a Common Standard of Insulin C-peptide Measurements by Different Laboratories. *Diabetologia* 18, 197-204(1980)
32. Kaneko, T., Oka, H., Munemura, M.: Radioimmunoassay of Human Proinsulin C-peptide Using Synthetic Human Connecting Peptide. *Endocrinol. Japon.* 21(2), 141-145(1974)

33. Heding, L.G., Larsen, U.D., Markussen, K.H.: Radioimmunoassay for Human, Pork and Ox C-peptides and Related Substances. *Horm.Metabol.Res.* 5(Suppl.), 40-44(1974)
34. Heding, L.G.: Radioimmunological Determination of Human C-Peptide in Serum. *Diabetologia* 11, 541-548(1975)
35. Beischer, W., Keller, L., Maas, M.: Human C-Peptide. Part 1: Radioimmunoassay, *Klin.Wschr.* 54, 709-715(1976)
36. Faber, O.K., Markussen, J., Naithani, V.K.: Production of Antisera to Synthetic Benzyloxycarbonyl-C-peptide of Human Proinsulin. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 357, 751-757(1976)
37. Heding, L.G.: Specific and Direct Radioimmunoassay for Human Proinsulin in Serum. *Diabetologia* 13, 467-474(1977)
38. Rainbow, S.J., Woodhead, J.S., Yue, D.K.: Measurement of Human Proinsulin by an Indirect Two-Site Immunoradiometric Assay. *Diabetologia* 17, 229-234(1979)
39. Tager, H.S.: Coupling of Peptides to Albumin with Difluorodinitrobenzene; *Anal Bioch* 71, 367-375(1976)
40. Lehninger, A.L.: *Biochemie*, Verlag Chemie, Weinheim, W.-Germany, 83(1975)
41. Harris, E., Stahl, W.L.: Organization of Thiol Groups of Electric Eel Electric-Organ Sodium-plus-Potassium Ion-Stimulated Adenosine Triphosphatase Studied with Bifunctional Reagents. *Biochem J.* 185, 787-790(1980)
42. Deyev, S.M., Afanasenko, G.A., Polyanovsky, O.L.: Two-Step Modification of Aspartate Aminotransferase with 1,5-Difluoro-2,4-Dinitrobenzene. *Biochim.Biophys.Acta*, 534, 358-367(1978)
43. Golds, E.E., Braun, P.E.: Protein Associations and Basic Protein Conformation in the Myelin Membrane. The Use of Difluorodinitrobenzene as a Cross-Linking Reagent. *J.Biol.Chem.* 253(22), 8162-8170(1978)

44. Beyer, J., Krause, U.: The C-Peptide; biogenesis, structure and methods of determination [in: C-Peptide-Proceedings of the First International Symposium on C-Peptide, Mainz, 17(1977)]
45. Mahler, Cordes: Biol.Chem., 7. Aufl., 31(1969)
46. Meister, A.: Biochem. of the Amino Acids, 2. Aufl., Bd.I, 47(1965)
47. Krause, U.: Calculation of the half-life of C-Peptide on the basis of basal serum C-Peptide and insulin levels [in: C-Peptide-Proceedings of the First International Symposium on C-Peptide, Mainz, 28(1977)]
48. Sundby, F., Markussen, J.: Preparative method for the isolation of C-Peptides from ox and porc pancreas. Horm.Metab.Res. 2, 17(1970)
49. Yalow, R.S., Berson, S.A.: Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. J.Clin.Invest. 39, 1157(1960)

C. Danksagung

Herrn Prof.Dr.med. Jürgen Beyer danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung der Arbeitsmöglichkeiten in den Laboratorien der Abteilung für Klinische Endokrinologie.

Herrn Dr.phil.nat. Ulrich Krause danke ich vielmals für die Überlassung des Themas sowie für seinen regelmäßigen theoretischen und praktischen Beistand bei den Laboratoriumsuntersuchungen und den Tierversuchen.

Herrn Prof.Dr.rer.nat. Bernhard Morsches danke ich für die freundliche Zurverfügungstellung des Tierversuchslabors in der Abteilung für Dermatologie und Venerologie.

Fräulein I. Berner danke ich für die Insulin- und C-Peptidbestimmungen.

Herrn B. Bender danke ich für die gute Pflege der Versuchstiere sowie für seine Assistenz bei der Immunisierung, Blutentnahme und Entblutung der Versuchstiere.

Meiner Freundin Eveline Schöneck danke ich für Schreib- und Korrekturarbeiten.

D. Curriculum vitae

Am 27. August 1955 wurde ich als Sohn des Franz Schmidt und dessen Ehegattin Elfriede, geb. Deußer in Erzhausen geboren. Vom 25. April 1962 bis zum 31. März 1966 besuchte ich die hiesige Volksschule und wechselte anschließend auf das Justus-Liebig-Gymnasium in Darmstadt über, wo ich am 5. Mai 1975 mein Abitur ablegte. Vom 1. August 1975 bis zum 30. September 1975 absolvierte ich mein Krankenpflegapraktikum auf einer chirurgischen Abteilung des Elisabethenkrankenhauses in Darmstadt.

Am 17. April 1976 begann ich in Mainz an der Johannes Gutenberg-Universität mein Medizinstudium. Am 22. März 1978 bestand ich dort meine Ärztliche Vorprüfung, am 22. März 1979 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Vom 15. August 1979 bis zum 16. September 1979 famulierte ich bei der Ärztin für Allgemeinmedizin Frau Dr.med. H.Wellmer in Darmstadt sowie anschließend vom 17. September 1979 bis zum 14. Oktober 1979 bei dem Facharzt für Röntgenologie und Strahlenkunde Herrn Dr.med. K.Loewenhardt in Darmstadt. Meine Krankenhausfamulatur absolvierte ich vom 1. März 1980 bis zum 31. März 1980 sowie vom 1. August 1980 bis zum 31. August 1980 im Marienhospital in Darmstadt auf den Gebieten Gynäkologie, Geburtshilfe, Chirurgie, Anästhesie und Innere Medizin.

Am 20. März 1981 bestand ich in Mainz den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Anschließend wechselte ich zum Internatsjahr von der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz auf die Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main über.

Vom 27. April 1981 bis zum 16. August 1981 habe ich an den Städtischen Kliniken in Frankfurt-Höchst auf der Abteilung für Urologie bei Herrn Chefarzt Dr.med. Wiegink das I. Tertial meines Internatsjahres absolviert. Vom 17. August 1981 bis zum 6. Dezember 1981 war ich im II. Tertial loco ipso auf der Ab-

teilung für Innere Medizin bei Herrn Prof. Dr. med. Becker tätig. Vom 7. Dezember 1981 bis zum 28. März 1982 war ich im III. Terial an gleicher Stelle auf der Abteilung für Chirurgie bei Herrn Prof. Dr. med. Schön tätig. Den mündlichen Teil meines III. Medizinischen Staatsexamens habe ich am 2. April 1982 in Frankfurt-Höchst bestanden. Den schriftlichen Teil und damit die Ärztliche Prüfung bestand ich am 6. April 1982 in Frankfurt am Main. Meine Approbation als Arzt wurde mir am 27. April 1982 vom Regierungspräsidenten in Darmstadt erteilt.

